

PCT

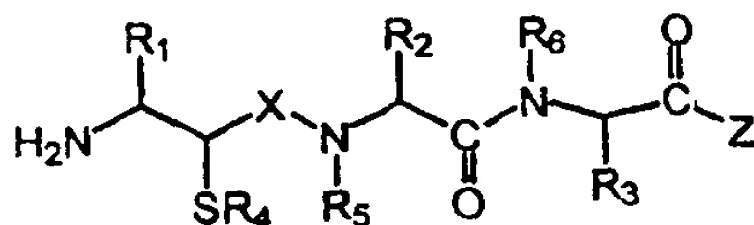
ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|--|-----------|--|
| 51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 5/02, A61K 38/06, G01N 33/68 | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 99/24461 (43) Date de publication internationale: 20 mai 1999 (20.05.99) |
| 21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02401 22) Date de dépôt international: 10 novembre 1998 (10.11.98) 30) Données relatives à la priorité: 97/14104 10 novembre 1997 (10.11.97) FR 71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). 72) Inventeurs; et 75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MARTIN, Loïc [FR/FR]; 28, rue Berthelot, F-92120 Montrouge (FR). CORNILLE, Fabrice [FR/FR]; 1, allée Aldbaran, F-91400 Bures sur Yvette (FR). FOURNIE-ZALUSKI, Marie-Claude [FR/FR]; 16, avenue de Bouvines, F-75011 Paris (FR). ROQUES, Bernard [FR/FR]; 12, rue Eugène Delacroix, F-94410 Saint Maurice (FR). (74) Mandataires: LE GUEN, Gérard etc.; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR). | | (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale. |

(54) Title: CLOSTRIDIAL TOXIN INHIBITORS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAME
 (54) Titre: INHIBITEURS DE TOXINES CLOSTRIDIALES ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT



(I)

(57) Abstract

The invention concerns a compound of general formula (I) and further concerns pharmaceutical compositions containing them, particularly useful for inhibiting the activity of clostridial toxins, in particular tetanus toxin and the seven serotypes of botulinum neurotoxins of type A to G.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet un composé de formule générale (I). Elle se rapporte en outre à des compositions pharmaceutiques les contenant, utiles notamment pour inhiber l'activité des toxines clostridiales, en particulier la toxine tétanique et les sept sérotypes de neurotoxines botuliques de types A à G.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | | | |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie | ES | Espagne | LS | Lesotho | SI | Slovénie |
| AM | Arménie | FI | Finlande | LT | Lituanie | SK | Slovaquie |
| AT | Autriche | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Sénégal |
| AU | Australie | GA | Gabon | LV | Lettonie | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaïdjan | GB | Royaume-Uni | MC | Monaco | TD | Tchad |
| BA | Bosnie-Herzégovine | GE | Géorgie | MD | République de Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbade | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tadjikistan |
| BE | Belgique | GN | Guinée | MK | Ex-République yougoslave de Macédoine | TM | Turkménistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | ML | Mali | TR | Turquie |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | MR | Mongolie | TT | Trinité-et-Tobago |
| BJ | Bénin | IE | Irlande | MN | Mauritanie | UA | Ukraine |
| BR | Bresil | IL | Israël | MW | Malawi | UG | Ouganda |
| BY | Bélarus | IS | Islande | MX | Mexique | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada | IT | Italie | NE | Niger | UZ | Ouzbékistan |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon | NL | Pays-Bas | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NO | Norvège | YU | Yougoslavie |
| CH | Suisse | KG | Kirghizistan | NZ | Nouvelle-Zélande | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | République populaire démocratique de Corée | PL | Pologne | | |
| CM | Cameroun | KR | République de Corée | PT | Portugal | | |
| CN | Chine | KZ | Kazakhstan | RO | Roumanie | | |
| CU | Cuba | LC | Sainte-Lucie | RU | Fédération de Russie | | |
| CZ | République tchèque | LI | Liechtenstein | SD | Soudan | | |
| DE | Allemagne | LK | Sri Lanka | SE | Suède | | |
| DK | Danemark | LR | Libéria | SG | Singapour | | |
| EE | Estonie | | | | | | |

"Inhibiteurs de toxines clostridiales et compositions pharmaceutiques les contenant".

La présente invention concerne de nouveaux composés dotés de propriétés inhibitrices de l'activité des toxines clostridiales (tétaniques et botuliques), leurs procédés de préparation et les compositions pharmaceutiques correspondantes.

5 Malgré de larges programmes de vaccination dans le monde de nombreuses bactéries demeurent une menace pour l'homme. Introduites dans un organisme, elles y induisent la production de toxines variées et initient ainsi le développement de maladies graves voire létales.

10 Le tétanos et le botulisme sont deux exemples particuliers de maladies neuromusculaires graves, induites par des neurotoxines clostridiales, respectivement la toxine tétanique et les sept sérotypes de toxines botuliques, A, B, C, D, E, F et G.

15 En termes de prophylaxie, seuls un vaccin ainsi qu'un sérum antitétanique sont aujourd'hui disponibles. En revanche, il n'existe à ce jour aucune thérapie pour traiter les maladies déclarées.

20 Le mode d'action de ces toxines, au niveau moléculaire, n'a été mis en évidence que fort récemment, en 1992 par Schiavo et al. (Nature, 359, 832). Elles sont constituées de deux chaînes polypeptidiques, l'une lourde et l'autre légère, associées par un pont disulfure. La chaîne lourde est responsable de la liaison spécifique au neurone et de la pénétration cellulaire. La chaîne légère bloque l'exocytose des neurotransmetteurs par protéolyse sélective et distincte de trois protéines impliquées dans ce phénomène : la synaptobrevine, la syntaxine et SNAP -25. La dégradation de l'une ou l'autre de ces protéines 25 inhibe, dans le cas de la toxine tétanique, la libération des neurotransmetteurs inhibiteurs et, dans le cas des neurotoxines botuliques, la libération des neurotransmetteurs excitateurs.

30 Cette voie de protéolyse et l'appartenance de ces toxines à la famille des métalloendopeptidases à zinc ont dans un premier temps conduit les chercheurs à envisager une thérapie basée sur la mise en oeuvre d'inhibiteurs puissants et sélectifs de cette activité enzymatique.

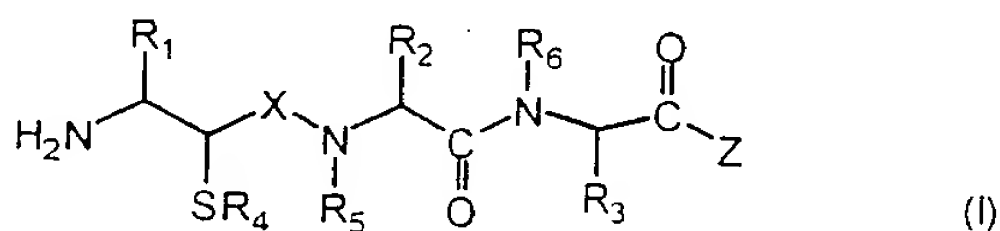
35 Toutefois, toutes les molécules connues comme étant des inhibiteurs puissants et sélectifs de protéases à zinc telles que le phosphoramidon pour la thermolysine, le captopril pour l'enzyme de conversion de l'angiotensine et le thiorphan pour l'endopeptidase neutre 24.11 et bien d'autres se sont révélées inefficaces même à des

concentrations millimolaires sur ces toxines (Soleilhac et al. (1996) Analytical Biochemistry, 241, 120-127 ; Cornille et al. (1994) Europ. J. Biochem., 222, 173-181 ; Shone et al. (1993) Europ. J. Biochem., 217, 965-971).

Il demeure donc à ce jour un besoin de médicaments pour traiter les maladies induites par les toxines clostridiales.

La présente invention a précisément pour objet de proposer de nouveaux composés capables d'inhiber, sélectivement ou conjointement, les activités enzymatiques de la toxine tétanique et des divers sérotypes de toxines botuliques. Ces composés sont des agents thérapeutiques potentiels du tétanos et du botulisme.

Plus précisément, la présente invention concerne des nouveaux composés de formule générale (I) :



dans laquelle :

- X représente :

- un groupement méthylène ou
- un groupement carbonyle,

- R₁ représente :

- un groupement alkyle, alkoxyalkyle, alkylthioalkyle, haloalkyle, cycloalkyle, hétérocycloalkyle, (cycloalkyl)alkyle, (hétérocycloalkyle)alkyle, aryle, arylalkyle, hétéroaryle, ou (hétéroaryl)alkyle, substitué sur la chaîne alkyle ou sur le cycle par au moins un groupement R₇ choisi parmi :

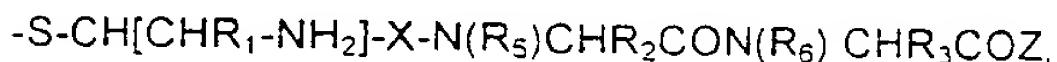
- un groupe sulfonamide -SO₂NH₂, -SO₂NHR₈ ou -SO₂N(R₈)₂,
- un groupe amide, -CONH₂, -CONHR₈ ou -CON(R₈)₂,
- un groupe amine NH₂, -NHR₈ ou -N(R₈)₂ et
- un groupe guanidinyne

avec R_8 étant un groupement alkyle, cycloalkyle, (cycloalkyl)alkyle, aryle ou arylalkyle,

- R_2 , R_3 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupement alkyle, alkoxyalkyle, carboxyalkyle, haloalkyle, hydroxyalkyle, aminoalkyle, alkylthioalkyle, cycloalkyle, hétérocycloalkyle, (cycloalkyl)alkyle, (hétérocycloalkyle)alkyle, aryle, arylalkyle, arylarylalkyle, hétéroaryle, (hétéroaryl)alkyle, carbamoylalkyle, guanidinylalkyle,

- R_4 représente

- un atome d'hydrogène,
- un groupement acétyle,
- un groupement benzoyle,
- un groupement $-SR_9$ avec R_9 étant un groupement alkyle, cycloalkyle, (cycloalkyl)alkyle, aryle, arylalkyle, ou
- un groupement



avec R_1 , X , R_5 , R_2 , R_6 , R_3 et Z tels que définis ci-dessus ou ci-après,

- R_5 et R_6 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupement alkyle, cycloalkyle, (cycloalkyl)alkyle, aryle, arylalkyle, hétéroaryle, (hétéroaryl)alkyle,

- R_2 et R_5 pris ensemble peuvent éventuellement constituer avec l'atome d'azote portant R_5 un groupement hétérocycloalkyle éventuellement condensé avec un aryle, ou un hétéroaryle,

- R_3 et R_6 pris ensemble peuvent éventuellement constituer avec l'atome d'azote portant R_6 un groupement hétérocycloalkyle éventuellement condensé avec un aryle ou un hétéroaryle,

- Z représente un groupement OH, OR₁₀, NH₂, NHR₁₀, N(R₁₀)₂, avec R₁₀ étant un groupement alkyle, cycloalkyle, (cycloalkyl)alkyle, aryle ou arylalkyle et leurs dérivés.

Les définitions des différents groupements proposés dans la formule générale I des composés revendiqués sont précisées dans la liste ci-dessous. Ces définitions s'appliquent aux termes tels qu'ils sont utilisés à travers ce texte (à moins qu'elles soient limitées à des exemples précis) soit individuellement soit en tant que faisant partie d'un groupe plus large.

C'est ainsi qu'au sens de l'invention, on entend désigner par :

- alkyle et alkoxy, une chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée comportant de 1 à 7 atomes de carbone ;

- halo-alkyle, un groupement alkyle dans lequel au moins un hydrogène est remplacé par un atome de chlore, de brome, d'iode ou de fluor. A titre représentatif d'un tel groupement on peut citer notamment les groupements pentafluoroéthyle, 2,2,2-trichloroéthyle, chlorométhyle, bromométhyle et plus préférentiellement le bromométhyle ;

- cycloalkyle, un groupement cycloalkyle ayant 3, 4, 5, 6 ou 7 atomes de carbone non substitué ou substitué par 1, 2, ou 3 groupements alkyle, aryle, alkoxy, alkylthio, hydroxy, amino, alkylamino, dialkylamino, nitro, trifluorométhyle, ou atomes de chlore, brome, iode ou fluor ;

- hétérocycloalkyle, un groupement cycloalkyle comportant au moins un hétéroatome pris parmi l'azote, l'oxygène ou le soufre et portant le cas échéant au moins un substituant tel que défini précédemment pour le cycloalkyle ;

- aryle, un groupement phényle ou naphtyle non substitué ou substitué par 1, 2 ou 3 groupements alkyle, alkoxy, alkylthio, hydroxy, amino, alkylamino, dialkylamino, nitro, trifluorométhyle, ou atome de chlore, brome, iode ou fluor ;

- hétéroaryle, un groupement 2- ou 3-furanyle, 2- ou 3-thiényle, 2-, 3- ou 4-pyridinyle, 4-imidazolyle et 3-indolyle.

A titre illustratif des groupements hétérocycliques susceptibles d'être constitués par R₃, R₅ et l'atome d'azote portant R₅ ou par R₃, R₆ et l'atome d'azote portant R₆, on peut notamment citer les

hétérocycles azotés comme les carboxy 2-pipéridinyle et carboxy 2-pyrrolidinyle.

Au sens de la présente invention, on entend couvrir sous le terme "dérivés" notamment les sels d'addition des composés de formule générale (I) obtenus avec des acides organiques ou minéraux pharmacologiquement acceptables. Il peut par exemple s'agir de sels tels que les chlorhydrate, bromhydrate, sulfate, nitrate, borate, phosphate, méthane sulfonate, acétate, fumarate, succinate, ascorbate, oxalate, lactate, pyruvate, citrate, tartrate, maléate, malonate, benzoate, diaminobenzène sulfonate, chromoglycate, benzène sulfonate, cyclohexane sulfonate, toluène sulfonate, dipropyl acétate, glucose-1 phosphate, palmoate et palmitate.

Parmi ces dérivés, on peut également citer les dimères de composés de formule générale I, constitués par deux molécules de composés de formule générale I, identiques ou différentes, couplées entre elles au niveau de leurs atomes de soufre respectifs. Dans ce cas particulier, R₄ est représenté par le groupement -S-CH[CHR₁-NH₂]-X-N(R₅)CHR₂CON(R₆) CHR₃COZ, identifié précédemment.

De même, la présente invention s'étend aux différentes formes énantiomériques des composés revendiqués.

En effet, les composés de formule (I), possédant plusieurs carbones asymétriques, ils existent sous forme de mélanges soit racémiques ou de diastéréoisomères ou encore sous forme de stéréoisomères purs.

Les composés optiquement purs peuvent être isolés par des synthèses énantiosélectives ou des résolutions par des amines chirales. Dans le cas de procédés de préparation conduisant à des mélanges de stéréoisomères, une séparation par HPLC semi-préparative sur colonne (Vydac C₁₈, 10x250 mm, CH₃CN-H₂O) est effectuée, permettant une étude biochimique et pharmacologique séparée de chaque stéréoisomères.

Parmi ces stéréoisomères, sont préférés ceux possédant une configuration absolue (S) ou (R) sur le carbone portant le groupement R₁, (S) ou (R) sur le carbone portant la fonction -SR₄, et (S) sur les carbones portant les groupements R₂ et R₃.

De préférence, les composés selon l'invention comprennent à titre de R_1 un groupement alkyle, cycloalkyle, aryle, ou hétéroaryle, substitué par au moins un groupement $-SO_2NH_2$, $-SO_2NHR_8$, $-SO_2N(R_8)_2$, avec R_8 tel que défini précédemment.

Selon un autre mode particulier de l'invention, il s'agit de composés de formule générale (I) dans laquelle X représente une fonction carbonyle.

A titre de composés préférés selon la présente invention, on peut plus particulièrement citer les composés de formule générale (I) dans laquelle X représente une fonction carbonyle et R_1 représente un groupement alkyle, cycloalkyle, aryle, ou hétéroaryle, substitué par au moins un groupement $-SO_2NH_2$, $-SO_2NHR_8$, $-SO_2N(R_8)_2$, $-CONH_2$, $-CONHR_8$, $-CON(R_8)_2$, NH_2 , $-NHR_8$ ou $-N(R_8)_2$, avec R_8 tel que défini précédemment. Selon un mode préféré de l'invention, R_1 y représente un groupement choisi parmi les groupements $(CH_2)_nSO_2NH_2$, $(CH_2)_nCONH_2$ ou $(SO_2NH_2)Ph$, avec de préférence n compris entre 1 et 5. Plus préférentiellement, il s'agit d'un composé avec un groupement $(CH_2)_nSO_2NH_2$ avec n compris entre 1 et 5.

Plus préférentiellement, il s'agit de composés de formule générale I dans laquelle R_4 , R_5 , et R_6 représentent un atome d'hydrogène, X une fonction CO et avec R_1 représentant un groupement $(CH_2)_2SO_2NH_2$ ou un groupement $(SO_2NH_2)Ph$.

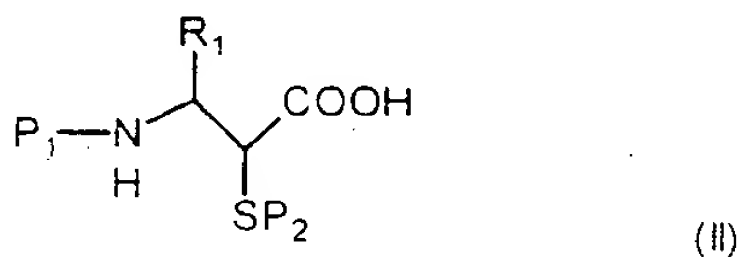
A titre illustratif des composés revendiqués selon l'invention on peut plus particulièrement citer les dérivés suivants :

- N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanoyl)- L-Valyl- L-Isoleucine,
- N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanoyl)- L-Valyl)- L-Isoleucyl- benzylamide,
- N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanoyl)- L-Tyrosyl- L-Histidine,
- N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanoyl)- L-Tyrosyl)- L-Histidyl-benzylamide,

- N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentyl)-L-Tyrosyl)-L-Histidine,
- N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 3-(3-sulfamoyl) phényl propanoyl)- L-Tyrosyl)- L-Histidyl-benzylamide,
- 5 - N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-carbamoyl pentanoyl)-L-β (2-naphtyl)-Ala-L-β(2-naphtyl)-Alanine,
- N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-carbamoyl pentanoyl)-L-Trp)-L-Leucine.

10 La présente invention a également pour objet des procédés de préparation des composés revendiqués.

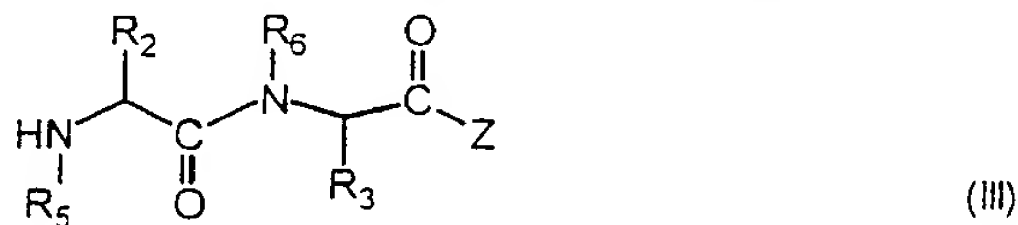
Les composés de formule générale (I) dans laquelle X représente un groupement carbonyle, CO, peuvent être préparés par
15 couplage d'un acide de formule générale (II) :



dans laquelle:

- 20 - P_1 représente un groupement tertbutoxycarbonyle ou benzyloxycarbonyle,
- P_2 représente un groupement 4-méthoxybenzyle ou 2,4 diméthoxybenzyle,
- avec R_1 étant défini comme précédemment.

25 avec une amine de formule générale (III)



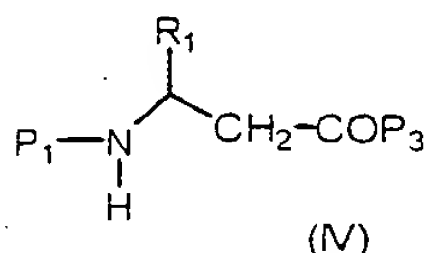
dans laquelle:

30 R_2 et R_3 , R_5 , R_6 et Z sont définis comme précédemment,

dans un solvant organique, en présence d'un agent de couplage et d'une amine tertiaire, à une température de l'ordre de 20°C.

Généralement, le couplage de l'acide de formule (II) sur l'amine générale (III) est effectué en opérant dans un solvant organique comme le dichlorométhane ou le diméthylformamide, en utilisant comme réactif de couplage, un composé du type BOP [benzotriazol-1-yl-oxy-tris(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate], HATU [O-(7-azabenzotriazol-1-yl)1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate], ou TFFH [tétraméthylfluoro formamidinium hexafluorophosphate] à une température de mélange réactionnel voisine de 20°C et en présence d'une amine tertiaire comme la diisopropyléthylamine.

Ces produits de formule générale (II) peuvent préalablement être obtenus par sulfénylation électrophile du β -amino ester protégé de formule (IV),

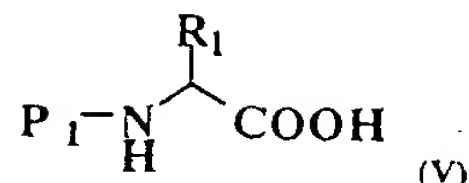


Dans cette formule, P_1 et R_1 sont définis comme précédemment, P_3 représente un groupement méthoxy, éthoxy, allyloxy ou une copule chirale telle que celle décrite par Evans ou par Oppolzer permettant ainsi une synthèse énantiosélective par action d'un disulfure asymétrique.

Généralement, le disulfure asymétrique de 4-méthoxybenzyle et de 2,4-dinitrophényle est ajouté sur l'énolate du β -amino-ester protégé (IV), obtenu par traitement du β -amino ester (IV) par le diisopropylamidure de lithium dans le THF à -78°C. La saponification des produits obtenus précédemment est effectuée par la soude dans un mélange d'eau et de méthanol à une température comprise entre 0°C et 20°C, pour conduire aux produits de formule générale (II).

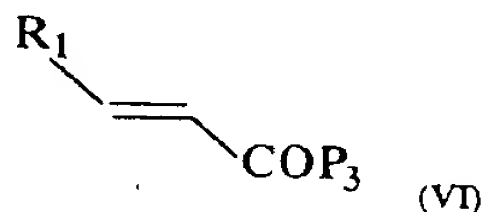
Ces produits de formule (IV) peuvent préliminairement être obtenus soit :

- par homologation selon la réaction de Arndt-Eistert à partir de l'acide-amino protégé de formule (V):

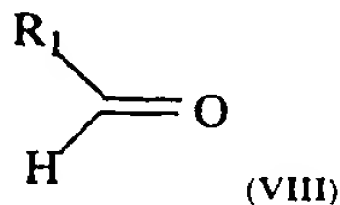
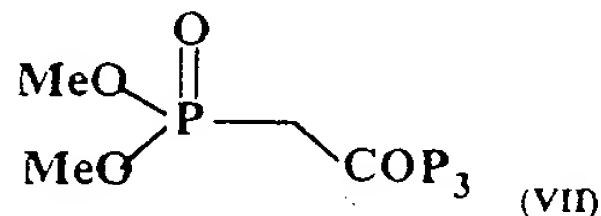


ce produit de formule (V) étant converti en diazocétone par addition de diazométhane sur l'anhydride mixte obtenu par traitement de (V) avec le chloroformiate d'isobutyle. Le réarrangement de Wolff avec du benzoate, d'argent en présence d'un alcool (méthanol, éthanol, alcool allylique ou autre) conduit alors au composé de formule (IV), ou

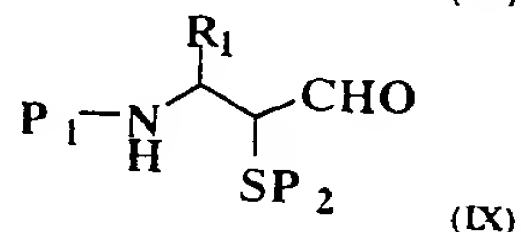
- par addition de Michael de l'amidure de lithium de la benzyl-1-phényléthylamine (+) ou (-) sur l'ester α,β insaturé de formule (VI). L'utilisation de cette amine secondaire chirale permet une synthèse parfaitement énantiosélective ($ee > 99\%$), la configuration obtenue dépendant de la configuration absolue de l'amine de départ. La débenzylation du β -amino acide est obtenue par hydrogénolyse sous 20 bars d'hydrogène en présence d'hydroxyde de palladium sur charbon et en présence de Boc_2O afin de protéger l'amine primaire obtenue par un groupement *t*-butoxycarbonyl (P_1).



L'ester (VI) peut être lui même obtenu par réaction de Wittig d'un composé de formule (VII) sur une aldéhyde de formule (VIII).



Les composés de formule générale (I) dans laquelle X représente un groupement méthylène, CH₂, peuvent être préparés par traitement d'une amine de formule générale (III) telle que définie précédemment avec une aldéhyde de formule (IX)



dans laquelle R₁, P₁ et P₂ sont définis comme précédemment, au sein d'un solvant organique et en présence d'un catalyseur.

De préférence, le traitement de l'amine (III) sur l'aldéhyde (IX) est effectué dans un solvant organique en présence d'acide paratoluènesulfonique en tant que catalyseur pour la formation de l'imine suivie de la réduction par le cyanoborohydrure de sodium conduisant au composé de formule (I), dans lequel X = CH₂.

Les produits de formule (IX) sont généralement obtenus par réduction en alcool des composés de formule (II) suivie d'une oxydation de Swern en aldéhyde.

La transformation de (II) en alcool est obtenue par réduction au borohydrure de sodium de l'anhydride mixte de (II). L'oxydation de Swern est réalisée par action du DMSO en présence de chlorure d'oxalyle dans un solvant organique.

Les amines de formule (III) sont généralement obtenues par formation successive de liaisons peptidiques soit en phase liquide soit en phase solide selon la méthode de Merrifield sur des résines diversement substituées afin d'obtenir les différentes protections de l'acide C-terminal. A l'exception des structures où R₂ et R₅ (respectivement R₃ et R₆) pris ensemble constituent un cycle, les substitutions R₅ et R₆ des groupes amino sont obtenues soit par formation de la base de schiff entre l'aldéhyde correspondant à R₅ et l'acide aminé supportant R₂, ou entre l'aldéhyde correspondant à R₆ et l'acide aminé supportant R₃ respectivement puis réduction par le cyanoborohydrure de sodium.

Les composés revendiqués s'avèrent capables d'inhiber significativement l'activité enzymatique des toxines clostridiales comme la toxine tétanique et les sept sérotypes de toxine botulique.

5 A ce titre, les composés revendiqués peuvent être utilisés en thérapie dans tous les processus pathologiques induits par des toxines clostridiales.

Plus précisément, les applications cliniques pour lesquelles on peut envisager l'utilisation de ces composés comprennent les maladies initiées par des toxines de type tétanique ou botulique.

10 A ces fins, les composés revendiqués et leurs dérivés peuvent être utilisés pour la préparation de compositions pharmaceutiques correspondantes.

Plus particulièrement, la présente invention concerne, selon un autre de ses aspects, une composition pharmaceutique comprenant en tant que principe actif au moins un composé de formule générale (I) ou un de ses dérivés.

Bien entendu, ce composé peut y être associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

20 De même on peut envisager d'introduire conjointement deux ou plusieurs composés de formule générale I dans une même composition pharmaceutique.

Ces compositions pharmaceutiques peuvent être administrées par voie orale, parentérale, sublinguale, transdermique ou topique.

25 En ce qui concerne l'administration par voie orale ou sublinguale, on utilise en particulier des comprimés, simples ou dragéifiés, des gélules, des granules éventuellement à libération retardée, des gouttes ou encore des liposomes. En ce qui concerne l'administration par voie intraveineuse, sous-cutanée ou intramusculaire, on a recours à des solutions stériles ou stérilisables en particulier pour perfusion veineuse, 30 tandis que l'on peut réaliser les patches conventionnels pour l'administration par voie transdermique. Pour l'utilisation topique on peut utiliser des crèmes ou des lotions à étendre sur la peau.

35 Les compositions pharmaceutiques selon la présente invention peuvent être préparées selon des méthodes usuelles bien connues dans le domaine de la technique pharmaceutique.

Le principe actif peut être incorporé dans les excipients habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les différents agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs, etc.

La quantité de principe actif à administrer par jour dépend bien entendu de la particularité de l'indication thérapeutique, de la gravité des affections à traiter, ainsi que du poids du malade et de la voie d'administration.

Pour une administration systémique, la dose globale chez l'homme varie généralement entre 1 et 100 mg par jour, par exemple de 2 à 50 mg, et plus convenablement de 3 à 40 mg par jour.

Des formes unitaires de dosage pour l'administration systémique comprendront généralement de 3 à 50 mg (à savoir 3, 5, 10, 20, 30, 40, et 50 mg de produit). Ces doses unitaires seront administrées normalement une ou plusieurs fois par jour, de préférence une à trois fois par jour.

Pour l'administration topique, les compositions pharmaceutiques contiennent généralement de 0,0001 à 1 % de principe actif et de préférence de 0,01 à 5 %.

Outre cette utilisation des composés de formule générale (I), à titre d'agent thérapeutique potentiel des maladies induites par des toxines clostridiales, comme le tétanos ou le botulisme, on peut également envisager leur utilisation conjointe avec des toxines, botuliques par exemple, à des fins thérapeutiques.

En effet, il a été développé en clinique humaine des méthodes de traitement thérapeutiques symptomatiques des dystonies par hyperactivité motoneuronale. Ce type de prophylaxie est en particulier proposé pour traiter des troubles du type strabisme, blépharospasme, crampe de l'écrivain, spasme hémifacial. La thérapie consiste à injecter des doses de toxines clostridiales au niveau de l'organisme traité. Il est clair que compte tenu du caractère toxique de ces toxines, les doses mises en oeuvre, doivent être minimisées de manière à prévenir tout effet secondaire néfaste. La co-administration d'un composé selon l'invention

avec une toxine offre donc la possibilité d'employer des doses plus importantes et donc plus efficaces de ces toxines.

5 En conséquence, les composés selon l'invention fournissent avantageusement un antidote pour toute activité non désirée de neurotoxines botuliques, administrées en clinique humaine.

10 On peut également envisager le développement de protocole de co-administration permettant la détection et/ou titration de l'activité de ces toxines dans des cibles musculaires définies pour atteindre le résultat clinique désiré.

15 En conséquence, la présente invention a également pour objet l'utilisation conjointe d'au moins un composé de formule générale (I) avec au moins une toxine clostridiale comme la toxine tétanique ou la neurotoxine botulique et propose une composition pharmaceutique comprenant au moins un composé de formule générale I en mélange avec au moins une toxine clostridiale. Selon un mode particulier de l'invention, il s'agit d'une toxine tétanique ou d'une neurotoxine botulique

20 Les composés décrits selon l'invention peuvent également être utilisés dans le cadre d'applications non thérapeutiques en particulier dans des systèmes de diagnostic et de détection de neurotoxines clostridiales dans des cibles musculaires.

25 En effet, l'inhibition sélective de tel ou tel sérotype de toxines clostridiales par les composés décrits dans cette invention peut permettre dans un test enzymatique in vitro d'identifier avec certitude le sérotype de toxine contaminant une solution aqueuse et pouvant contenir d'autres enzymes.

30 La présente invention a également pour objet un système de diagnostic pour détecter des neurotoxines clostridiales (tétanique et botuliques) caractérisé en ce qu'il comprend au moins un composé de formule générale I.

35 Les exemples présentés ci-après à titre non limitatif mettront en évidence d'autres avantages de la présente invention.

Les protons de spectre de résonance magnétique nucléaire sont numérotés selon les règles de nomenclature en vigueur et les déplacements chimiques sont mesurés en ppm en utilisant le 1,1,1,3,3,3-hexaméthylidisilazane (HMDS) comme étalon interne.

5

A - PROCÉDE DE PRÉPARATION GÉNÉRAL DE PEPTIDYL RÉSINE

La synthèse des peptidyl résines H-A₁-A₂-dichlorotriylrésine (respectivement H-A₁-A₂-HMP-résine ou H-A₁-A₂-Rink-amide-résine) est réalisée sur la dichlorotriylrésine substituée à 1,35 mmol/g (respectivement HMP-résine ou Rinkamide-résine substituée à 1,0 mmol/g) en utilisant la stratégie Fmoc sur un synthétiseur Applied Biosystems ABI 431B[®]. L'acide aminé protégé Fmoc-A_n-OH (1mmol) est couplé à 125 mg (200 µmol) de dichlorotriyl-résine dans la NMP en présence de diisopropyléthylamine (DIEA) (respectivement, à 150 mg de HMP-résine (150 µmol)) en présence de DCC (dicyclohexylcarbodiimide) et de DMAP (diméthylaminopyridine). Le groupement α-amino est déprotégé par un traitement avec 20% de piperidine dans la NMP (N-méthylpyrrolidone). Les différents acides Fmoc-A_n-OH (1 mmol), sont successivement couplés dans la NMP en utilisant comme agent d'activation le couple dicyclohexylcarbodiimide (DCC)/ 1-hydroxybenzotriazole (HOBt). Le groupement Fmoc est clivé avec une solution de 20% en piperidine dans la NMP. Après chaque couplage et déprotection, la résine est alternativement lavée avec de la NMP et du dichlorométhane.

25

B - PROCÉDE DE PRÉPARATION DES DIFFÉRENTS SYNTHONS:

30

BI) SYNTHÈSE DU SYNTHON 1:

Acide 2-(paraméthoxybenzyl-thio)-, 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino)-, 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoïque.

35

Ce synthon est commun aux exemples 1, 2, 3, 4 et 5.

I-) Acide (2SR), 4, 4'-dithiobis, 2-(N-benzyloxycarbonyl)-amino, butanoïque ou (SR) (Z - HOMOCYS - OH)₂

5 A un mélange de dioxanne (100 ml) / eau (100 ml), on ajoute à 0 °C, 5,52 g de soude en pastilles (137,9 mmol) puis 18,5 g (68,94 mmol) de (SR) (D,L) Homocystine commerciale. On coule alors goutte à goutte une solution de chloroformiate de benzyle (100 ml). Pendant l'addition, on ajuste le pH à 9 avec une solution de NaOH (1N) puis on laisse revenir à température ambiante et on agite pendant 2 heures. On évapore le dioxanne puis on ajoute de l'acétate d'éthyle et on acidifie la phase aqueuse avec HCl 2N jusqu'à pH=1. On l'extrait à trois reprises avec de l'acétate d'éthyle puis on sèche la phase organique avec une solution de NaCl saturée et un passage sur Na₂SO₄. Après évaporation à sec, on reprend la phase organique avec du toluène puis avec du dichlorométhane.

10 On obtient, avec un rendement de 99,2%, 36,7 g (68,39mmol) de (Z - Homocys- OH)₂ dont les caractéristiques sont les suivantes:

20 R_f (MeOH:CH₂Cl₂:H₂O:AcOH 3:7:0,6:0,3)= 0,55
1H RMN (d₆-DMSO) δ 1.85 à 2.00 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.00 à 2.15 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.70 (t, 2H, CH-CH₂-CH₂), 4.08 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 4.97 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 7.30 (m, 5H, CH aromatiques), 7.58 (d, 1H, NH-Z).

25 II-) (2SR), 4, 4'-dithiobis, 2-(N-benzyloxycarbonyl)-amino butanoate de méthyle ou (SR) (Z - Homocys - OMe)₂

30 A une solution de 36,7 g de (Z-Homocys-OH)₂, dans un mélange de dichlorométhane (50 ml) / éther (50 ml) refroidi à 0°C, on ajoute un excès de diazométhane. Après 1 heure, l'excès de diazométhane est neutralisé par ajout d'AcOH jusqu'à disparition de la coloration jaune. On évapore à sec. On obtient, avec un rendement de 89,5%, 34,52 g de (Z - Homocys - OMe)₂ dont les caractéristiques sont les suivantes:

Rf (AcOEt/cyclohexane 3:7) = 0,27

¹H RMN (d₆-DMSO) δ 1.82 à 2.10 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 2.68 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 3.60 (s, 3H, COOMe), 4.13 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 4.99 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 7.2 à 7.4 (m, , 5H, CH aromatiques), 7.73 (d, 1H, NH-Z)

III-) (2SR), 2-(N-benzyloxycarbonyl)-amino, 4-(N-tertiobutylaminosulfonyl) butanoate de méthyle

10 A une solution de 34,51 g (61,19 mmol) de (Z - Homocys - OMe)₂ refroidie à 0 °C dans 20 ml de MeOH et 250 ml de CCl₄, du chlore gazeux est mis à buller sous vive agitation pendant 35 minutes. On purge le mélange réactionnel avec de l'azote. L'évaporation à sec permet d'obtenir, avec un rendement de 87%, 37,25 g de 2-(N-benzyloxycarbonyl)-amino 4- (chlorosulfonyl) butanoate de méthyle .

15 A une solution de 37,25 g (106,5 mmol) du composé précédent dans 140 ml de CH₂Cl₂, refroidi à 0 °C est ajoutée rapidement une solution de 50 ml de tBuNH₂ dans 50 ml de CH₂Cl₂. Après 30 minutes d'agitation, on filtre le chlorhydrate de tBuNH₂. On rince avec un peu de CH₂Cl₂ puis on évapore à sec. On obtient, avec un rendement de 95%, 39,12 g de (2SR), 2-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 4-(N-tertiobutylaminosulfonyl) butanoate de méthyle dont les caractéristiques sont les suivantes:

25 Rf (AcOEt:CH₂Cl₂ 10:90) = 0,35

¹H RMN (d₆-DMSO) δ 1.18 (s, 9H, tBu), 1.89 à 2.15 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 2.84 à 3.09 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 3.59 (s, 3H, COOMe), 4.22 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 4.99 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 6.84 (s, 1H, SO₂-NH), 7.29 (m, 5H, CH aromatiques), 7.80 (d, 1H, NH-Z)

30 IV-) Acide (2SR), 2-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 4-(N-tertiobutylaminosulfonyl) butanoïque

35 A une solution de 39,12 g (101,22 mmol) de (2SR), 2-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 4-(N-tertiobutylaminosulfonyl) butanoate de méthyle dans 100 ml, refroidie à 0 °C, est ajoutée une solution de 11,33 g

(283,42 mmol) de NaOH dans 100 ml de MeOH. Après 3 heures d'agitation, on évapore le MeOH. On ajoute de l'eau. La phase aqueuse est extraite avec Et₂O. On acidifie la phase aqueuse avec KHSO₄ (2N) puis on extrait 3 fois avec de l'acétate d'éthyle. L'ensemble des phases organiques est lavé par de l'eau, séché sur sulfate de sodium et évaporé. On obtient avec un rendement de 99%, 37,40 g d'acide (2SR), 2-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 4-(N-tertiobutylaminosulfonyl) butanoïque dont les caractéristiques sont les suivantes:

Pf = 133°C

Rf (MeOH:AcOH:CH₂Cl₂) = 0,31

¹H RMN (d₆-DMSO) δ 1.08 (s, 9H, tBu), 1.75 à 2.00 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 2.70 à 2.84 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.84 à 2.98 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 3.98 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 4.86 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 6.72 (s, 1H, SO₂-NH), 7.19 (m, 5H, CH aromatiques), 7.56 (d, 1H, NH-Z), 12.70 (s, 1H, COOH).

V-) (3SR), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoate de méthyle

On dissout 20 g (53,7 mmol) d'acide (2SR), 2-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 4-(N-tertiobutylaminosulfonyl) butanoïque dans 15 ml de DMF, on y ajoute 100 ml de THF fraîchement distillé puis 7,1 ml (1,2 eq) de N-méthylmorpholine. A -15°C, on ajoute goutte à goutte 8,5 ml d'iBuOCOCl sous azote et on laisse agiter 20 minutes. Après filtration du chlorhydrate de N-méthylmorpholine, on ajoute un excès de diazométhane. Après une heure d'agitation, on évapore et on reprend à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont lavées avec H₂O, NaHCO₃ (10%), NaCl saturé puis on sèche sur Na₂SO₄ et on évapore pour obtenir avec un rendement quantitatif, 21,12 g de (3SR), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 4-oxo, 5-diazenyl, N-tertiobutylsulfonamide pentanoate.

A une solution de 21,12 g (53,28 mmol) de (3SR), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 4-oxo, 5-diazenyl, N-tertiobutylaminosulfonyl pentanoate dans 180 ml de méthanol, on coule goutte à goutte une solution de 1,64 g de benzoate d'argent dans 70 ml de triéthylamine. Après une agitation d'1 h 30, on ajoute une spatule de célite, une spatule

de charbon actif et 50 ml de NaCl. On agite pendant 1 heure et on filtre sur célite.

Le filtrat est évaporé à sec. Le résidu est repris avec de l'AcOEt. Les phases organiques sont lavées avec NaHCO₃ (10%), H₂O, KHSO₄ (1N) et NaCl saturé. On sèche sur Na₂SO₄ et on évapore à sec. Le produit est purifié sur une colonne de silice avec comme éluant le mélange suivant (20% AcOEt, 30% CH₂Cl₂, 50% cyclohexane). Après concentration, on obtient avec un rendement de 95%, 20,06 g de (3SR), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoate de méthyle dont les caractéristiques sont les suivantes:

Pf = 88°C

Rf (AcOEt:CH₂Cl₂:cyclohexane 1:1:1) = 0,48

¹H RMN (CDCl₃) δ 1.29 (s, 9H, tBu), 1.99 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 2.54 (d, 2H, CH₂-COOMe), 3.05 (t, 2H, CH-CH₂-CH₂), 3.61 (s, 3H, COOMe), 4.02 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 4.14 (s, 1H, SO₂-NH), 5.03 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 5.37 (d, 1H, NH-Z), 7.2 à 7.4 (m, 5H, CH aromatiques)

VI-) Acide (3SR), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoïque

10 g (25mmol) de (3SR), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoate de méthyle est saponifié selon la méthode décrite précédemment dans l'exemple B_{IV} en utilisant 2 équivalents de NaOH.

On obtient avec un rendement quantitatif, 9,65 g (25 mmol) d'acide (3SR), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoïque dont les caractéristiques sont les suivantes:

Rf (MeOH:AcOH:CH₂Cl₂) = 0,46

¹H RMN (d₆-DMSO) δ 1.18 (s, 9H, tBu), 1.67 à 1.90 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 2.37 (d, 2H, CH₂-COOH), 2.89 (t, 2H, CH-CH₂-CH₂), 3.83 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 4.95 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 6.77 (s, 1H, SO₂-NH), 7.29 (m, 5H, CH aromatiques)

VII-A) Acide (3S), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoïque

9,65 g (25 mmol) d'acide (3SR), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoïque sont résolus en utilisant un équivalent de D(+)- α -méthyl-benzylamine dans un système chloroforme/ isopropanol. On obtient avec un rendement de 73,9%, 3,571 g (9,24 mmol) d'acide (3S), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoïque. L'excès énantiomérique (94%) est déterminé après couplage avec la D(+)- α -méthyl-benzylamine et comparé avec la synthèse réalisée sur la L-homocystine. Les caractéristiques de ce produit sont les suivantes:

R_f (MeOH:AcOH:CH₂Cl₂ 5:5:90) = 0,46
¹H RMN (d₆-DMSO) δ 1.18 (s, 9H, tBu), 1.67 à 1.90 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 2.37 (d, 2H, CH₂-COOH), 2.89 (t, 2H, CH-CH₂-CH₂), 3.83 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 4.95 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 6.77 (s, 1H, SO₂-NH), 7.29 (m, 5H, CH aromatiques)

VII-B) L'acide (3R), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino) 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoïque

Il est obtenu par un protocole analogue en utilisant la D(-)- α -méthyl benzylamine.

VIII-A) (3S), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoate de méthyle

A une solution de 2,405 g (6,22 mmol) d'acide (3S), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoïque, 675 mg (7,09 mmol) de 4-hydroxypyridine dans 15 ml de pyridine, est ajouté à 0°C, 1,580 g (7,66 mmol) de dicyclohexylcarbodiimide (DCC). La suspension est agitée pendant 3 heures à température ambiante puis concentrée sous pression réduite. On ajoute, à 0°C, 10 ml de méthanol. On agite pendant une nuit à 50°C. La suspension est concentrée puis repris avec de l'AcOEt, le précipité de dicyclohexylurée est filtré. Le filtrat

est ensuite lavé avec KHSO_4 (1N), NaHCO_3 (10%), une solution saturée de NaCl, séché sur Na_2SO_4 puis évaporé sous pression réduite.

On obtient avec un rendement quantitatif, 2,49 g (6,22 mmol) de (3S), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoate de méthyle dont les caractéristiques sont les suivantes:

R_f (AcOEt:CH₂Cl₂:cyclohexane 1:1:1) = 0,48

¹H RMN (CDCl₃) δ 1.29 (s, 9H, tBu), 1.99 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 2.54 (d, 2H, CH₂-COOMe), 3.05 (t, 2H, CH-CH₂-CH₂), 3.61 (s, 3H, COOMe), 4.02 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 4.18 (s, 1H, SO₂-NH), 5.03 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 5.37 (d, 1H, NH-Z), 7.2 à 7.4 (m, 5H, CH aromatiques)

VIII-B) L'ester (3R) 3-(N-benzyloxycarbonyl amino) 5-(N-tertiobutyl amino sulfonyl) pentanoate de méthyle

Il est obtenu par un protocole analogue en utilisant l'acide (3R) décrit dans le paragraphe VII-B (synthon 1).

IX-A) (2S,3S), 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoate de méthyle.

Sous azote, 1,5 g (3,75 mmol) d'ester (3S), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylamino-thio) pentanoate de méthyle est dissout dans 10 ml de THF. A -78°C, 6 ml de LDA (2M/heptane/THF/ethylbenzene ; 4,80 mmol) sont ajoutés goutte à goutte. Après 30 minutes, on ajoute à -78°C 1,98 g (5,625 mmol) de disulfure de paraméthoxybenzyle et 2,4 dinitrophenyle, et la solution est agitée pendant 2 heures à -78°C. On ajoute KHSO_4 (1N), on extrait avec de l'acétate d'éthyle ; les phases organiques sont lavées par KHSO_4 (1N), NaCl saturée, séchées sur Na_2SO_4 puis évaporées sous pression réduite.

Après purification sur colonne de silice (AcOEt:CH₂Cl₂:cyclohexane 2:3:5), on obtient avec un rendement de 54%, 1,125g de (2S,3S) 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoate de méthyle dont les caractéristiques sont les suivantes. L'excès énantiomérique est supérieur à 95 % comme en témoigne l'analyse HPLC.

Rf (AcOEt:CH₂Cl₂:cyclohexane 1:1:1) = 0,57

Rf (AcOEt:CH₂Cl₂:cyclohexane 15:25:60) = 0,15

¹H RMN (CDCl₃) δ 1.25 (s, 9H, tBu), 1.86 à 2.30 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂),
2.96 (t, 2H, CH-CH₂-CH₂), 3.29 (2d, 1H, CH-S), 3.64 (s, 3H, COOMe),
3.72 (s, 5H, S-CH₂-C₆H₄-OMe), 4.02 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 4.87 (s, 1H,
SO₂-NH), 5.05 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 5.50 (d, 1H, NH-Z), 6.75 (d, 2H, CH
aromatiques ortho à OMe), 7.14 (d, 2H, CH aromatiques méta à OMe),
7.27 (m, 5H, CH aromatiques).

SM (ES), (M+H)⁺ m/z 539.3, (M+Na)⁺ m/z 561.3

IX-B) 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-
tertiobutylaminosulfonyl) pentanoate de méthyle.

Le composé analogue de configuration (2R, 3R) est obtenu
par le même protocole en utilisant le composé décrit en VIII-B (Synthon 1).

X-A) Acide (2SR,3S), 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-
benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoïque.

A 0,546 g de (2S,3S) 2-(paraméthoxybenzyl-thio),3-(N-
benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoate de
méthyle dans 5 ml de méthanol, on ajoute 1 ml de NaOH (6N). En suivant
les conditions opératoires décrites dans l'exemple B_{IV}, on obtient avec un
rendement de 91%, 484 mg d'acide (2SR, 3S), 2-(paraméthoxybenzyl-
thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl)
pentanoïque dont les caractéristiques sont les suivantes:

Rf (AcOEt:AcOH:CH₂Cl₂ 30:2:70) = 0,24 et 0,32

¹H RMN (CDCl₃) δ 1.21 (s, 9H, tBu), 1.79 à 1.93 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂),
1.96 à 2.10 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.97 (t, 2H, CH-CH₂-CH₂), 3.24 et
3.30 (d, 1H, CH-S), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.76 (s, 2H, CH₂-CH₄-OMe), 4.04
(m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 5.01 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 5.60 (d, 1H, NH-Z), 6.72
et 6.77 (d, 2H, CH aromatiques ortho à OMe), 7.12 et 7.17 (d, 2H, CH
aromatiques méta à OMe), 7.25 (br s, 5H, CH aromatiques).

X-B) (2SR, 3R) 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoïque.

5 Le deuxième couple de diastéréoisomères de configuration (2SR, 3R) est obtenu par le même protocole en utilisant le composé décrit en IX-B (synthon 1).

BII) VOIE DE SYNTHÈSE DU SYNTHON 2 :

10 Acide 2-paraméthoxybenzyl-thio, 3-Boc-amino, 5-trityl-carbamoyl pentanoïque.

Ce synthon est commun aux exemples 7 et 8 .

15 I-A) (3S), 3-(N-tButyloxycarbonyl-amino), 5-(N-Trityl-carbamoyl)-pentanoate de méthyle

20 A partir de 10 g (20,5 mmol) de (L) Boc Gln(Trt)COOH, on obtient en suivant les conditions opératoires de l'exemple Bv (Synthon 1), avec un rendement de 85 %, 4,35 g de (3S), 3-Boc-amino-5-Trityl-carbamoyl-pentanoate de méthyle dont les caractéristiques sont les suivantes:

Rf (AcOEt:CH₂Cl₂ 1:3) = 0,58

25 ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 1.32 (s, 9H, tBu), 1.25 à 1.37 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.40 à 1.53 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.20 (t, 2H, CH-CH₂-CH₂), 2.30 (d, 2H, CH₂COOMe), 3.50 (s, 3H, COOMe), 3.63 à 3.77 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 6.67 (d, 1H, NH-Boc), 7.08 à 7.22 (m, 15H, Trt), 8.50 (s, 1H, NH-Trt)

30 IB) (3R) 3-(Boc-amino) 5-(trityl carbamoyl) pentanoate de méthyle.

Ce composé est obtenu par le même protocole à partir de la Boc (D) Gln (Trt) COOH.

II-A) (2RS, 3S), 2-paraméthoxybenzyl-thio, 3-Boc-amino, 5-Trityl-carbamoyl-pentanoate de méthyle.

A partir de 1,032 g de (3S), 3-Boc-amino-5-Trityl-carbamoyl-pentanoate de méthyle, on obtient en suivant les conditions opératoires de l'exemple B_{IX} (Synthon 1), avec un rendement de 43%, 574 mg de (2RS, 3S), 2-paraméthoxybenzyl-thio, 3-Boc-amino, 5-Trityl-carbamoyl-pentanoate de méthyle dont les caractéristiques sont les suivantes:

R_f (AcOEt:CH₂Cl₂:cyclohexane 20:30:50) = 0,27

¹H RMN (d₆-DMSO) δ 1.32 (s, 9H, tBu), 1.28 à 1.37 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.86 à 1.95 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.10 à 2.24 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 3.22 (d, 1H, CH-S), 3.55 (s, 3H, COOMe), 3.67 (2s, 5H, S-CH₂-C₆H₄-OMe), 3.70 à 3.78 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 6.72 (d, 1H, NH-Boc), 6.79 (d, 2H, CH aromatiques ortho à OMe), 7.12 (d, 2H, CH aromatiques méta à OMe), 7.10 à 7.23 (m, 15H, Trt), 8.50 (s, 1H, NH-Trt)

MS (EI) 153, 243, 559, 669.

II-B) (2 RS, 3R), 2-paraméthoxy benzyl-thio, 3-(Boc-amino), 5-(Trityl-carbamoyl)-pentanoate de méthyle

Il est obtenu par le même protocole à partir du composé (IB) (Synthon 2).

III-A) Acide (2RS, 3S), 2-paraméthoxybenzyl-thio, 3-Boc-amino, 5-trityl-carbamoyl pentanoïque

A partir de 334 mg (0,5 mmol) de (2RS, 3S), 2-(synthon 1) B_x paraméthoxybenzylsulfanyl, 3-Boc-amino, 5-trityl-carbamoyl-pentanoate de méthyle, on obtient en suivant les conditions opératoires de l'exemple (Synthon 1) B_x, avec un rendement de 97%, 317 mg d'acide (2RS, 3S), 2-paraméthoxybenzylthio, 3-Boc-amino, 5-trityl-carbamoyl pentanoïque dont les caractéristiques sont les suivantes:

R_f (MeOH:CH₂Cl₂ 10:90) = 0,4

¹H RMN (d₆-DMSO) δ 1.30(1.39) (s, 9H, tBu), 1.55 à 1.66 (m, 1H, βCH₂(Gln)), 1.80 à 1.93 (m, 1H, βCH₂(Gln)), 2.13 à 2.26 (m, 2H, γCH₂(Gln)), 3.12 (3.18) (d, 1H, CH-S), 3.68 (s, 5H, CH₂-C₆H₅-OCH₃), 3.70 à 3.80 (m, 1H, αCH(Gln)), 6.62(6.70) (d, 1H, BocNH), 6.80 (d, 2H, CH arom ortho à OMe), 7.12 (d, 2H, CH arom méta à OMe), 7.10 à 7.25 (m, 15 H, Trt), 8.48 (8.52) (s, 1H, NHTrt)

III-B) Acide (2RS, 3R), 2-paraméthoxybenzyl-thio, 3-Boc-amino, 5-trityl-carbamoyl pentanoïque

Le composé analogue de configuration (2RS, 3R) est obtenu par le même protocole à partir du composé décrit en (IIB) (Synthon 2).

BIII) VOIE DE SYNTHÈSE DU SYNTHON 3:

Acide 2-(paraméthoxybenzyl-thio)-, 3-(N-t-butoxycarbonyl-amino)-, 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl)phényl) propanoïque.

Ce synthon est utilisé dans l'exemple 6.

I-) Acide 3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) benzoïque

A une solution de 12,5 g (56,6 mmol) de l'acide 3-chlorosulfonyl benzoïque dans 200 ml de CH₂Cl₂, refroidi à 0 °C est ajoutée rapidement une solution de 21 ml (198 mmol) de tBuNH₂ dans 50 ml de CH₂Cl₂. Après 30 minutes d'agitation, on filtre le chlorhydrate de tBuNH₂. On rince avec un peu de CH₂Cl₂ puis on évapore à sec. On obtient, avec un rendement de 95%, 13,83 g d'acide 3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) benzoïque dont les caractéristiques sont les suivantes :

R_f (AcOH/Toluene, 3/7) = 0,45

¹H RMN (d₆-DMSO) δ 1.05 (s, 9H, tBu), 7,65 (s, 1H, SO₂NH) 7,65(t, 1H aromatique), 8,00 (d, 1H, aromatique), 8,08 (d, 1H, aromatique), 8,33 (s, 1H, aromatique).

II-) 3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) phenyl methanol

A une solution de 12,94 g (50,3 mmol) d'acide 3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) benzoïque dans 100 ml de 1,2-diméthoxyéthane (DME) sont ajoutés successivement à -15°C 6,6 ml (60,3 mmol) de N-méthyl morpholine et 7,8 ml (60,3 mmol) de chloroformiate d'isobutyle. Après 5 minutes, le précipité de chlorhydrate de N-méthyl morpholine est filtré et lavé avec du DME. Au filtrat recueilli dans un grand ballon, est ajoutée à -15°C une solution de 5g (130 mmol) de NaBH₄ dans 10 ml d'eau. Après 30 minutes de réaction, 100 ml d'eau sont ajoutés et le DME évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est alors extraite par 2x100 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est alors lavée par NaCl saturé avant d'être séchée sur Na₂SO₄. On obtient, avec un rendement de 90 %, 10,9 g de 3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) phenyl méthanol dont les caractéristiques sont les suivantes:

¹H RMN (d₆-DMSO) δ 1.04 (s, 9H, tBu), 4.52 (d, 2H, CH₂OH), 5.36 (t, 1H, CH₂OH), 7.45 (s, 1H, SO₂NH), 7.46 (d, 2H, aromatique), 7.64 (dd, 1H, aromatique), 7.77 (s, 1H, aromatique).

R_f (AcOH/Toluène, 3/7) = 0,24

III-) 3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) benzaldehyde

A une solution de 4,7 ml (53,7 mmol) de chlorure d'oxalyl (fraîchement distillé) dans 100 ml de dichlorométhane, est ajouté goutte à goutte, à -78°C, sous azote, une solution de 9,5 ml (134 mmol) de DMSO dans 20 ml de dichlorométhane. Une solution de 10,9 g (44,8 mmol) de 3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) phényl méthanol dans 4ml de DMSO puis 30 ml de CH₂Cl₂ est coulé goutte à goutte. L'agitation est maintenue pendant 30 minutes, puis on ajoute 31,2 ml (224 mmol) de triéthylamine. Le mélange réactionnel est agité pendant 5 minutes supplémentaires à -65°C puis on laisse revenir le bain à température ambiante.

Après 1 h d'agitation, on ajoute de l'eau et la phase aqueuse est extraite au dichlorométhane. Les phases organiques sont combinées, lavées avec KHSO₄(1N), NaHCO₃(10%), NaCl saturée, séchées sur Na₂SO₄.

Après concentration sous pression réduite, on obtient avec un rendement de 96%, 10,45 g de 3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) benzaldehyde dont les caractéristiques sont les suivantes :

5 Rf (AcOEt/cyclohexane, 1/2) = 0,32

^1H RMN (DMSO) δ 1.05 (s, 9H, tBu), 7,70 (s, 1H, SO_2NH), 7,78(t, 1H, aromatique), 8,10 (d, 2H, aromatiques), 8,29 (s, 1H, aromatique), 10,05 (s, 1H, CHO).

10 IV-) 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) phenyl) propenoate d'éthyle

20,4 ml(102 mmol) de triéthyl phosphonoacetate sont coulés goutte à goutte à une suspension d'hydrure de sodium (3g, 104 mmol) dans le DME (200 ml). Après 30 minutes d'agitation à 45°C, 16,8 g
15 (69,6 mmol) de 3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) benzaldehyde sont ajoutés rapidement et le mélange agité pendant 45 minutes à 50 °C. On ajoute alors 250 ml de mélange eau-glace et on extrait par 250 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée par NaCl saturé avant d'être séchée sur Na_2SO_4 . Après concentration sous pression réduite, on
20 obtient avec un rendement de 95 %, 20,56 g de 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) phenyl) propenoate d'éthyle dont les caractéristiques sont les suivantes :

Rf (AcOEt/cyclohexane, 4/6) = 0,40

25 ^1H RMN (DMSO) δ 1.05 (s, 9H, tBu), 1,20 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 4,15 (q, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 6,65(d, 1H, $\text{CH}\phi$), 7,50 (s, 1H, SO_2NH), 7,58 (t, 1H, aromatique) 7,68(d, 1H, CH-COOEt), 7,82 (d, 1H, aromatique) 7,91 (d, 1H, aromatique), 8,10 (s, 1H, aromatique).

30 V-A) (3R) 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) phényl) 3-((S)-N-benzyl-1-phényléthylamino) propanoate d'éthyle

A une solution de 4g(18,9 mmol) de (S) (-) N-benzyl-1-phényléthylamine(préparé selon la procédure décrite par Juaristi , Murer
35 et Seebach(1993) Synthesis, p 1243-1246) dans 70 ml de THF anhydre sont ajoutés à 0°C 11,8 ml (18,9 ml) de nBuLi (1,6 M dans l'hexane). Le mélange réactionnel est agité 15 minutes puis refroidi à -78°C. 2,36 g

(7,56 mmol) dans 30 ml de THF sont ajoutés goutte à goutte au mélange réactionnel qui est agité 30 minutes supplémentaires avant d'ajouter 30 ml d'une solution aqueuse de KHSO₄ (1M). Après évaporation du THF, la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée par KHSO₄(1N), NaHCO₃ saturé, NaCl saturé, séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite.

Après purification sur colonne de silice (AcOEt/CH₂Cl₂/cyclohexane 1,5/1,5/7), on obtient avec un rendement de 87%, 3,28 g de (3R) 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) phényl) 3-((S)-N-benzyl-1-phényléthylamino) propanoate d'éthyle dont les caractéristiques sont les suivantes. L'excès énantiomérique est supérieur à 95 % comme en témoigne l'analyse HPLC et la RMN.

R_f (AcOEt/cyclohexane, 3/7) = 0,41

¹H RMN (CDCl₃) δ 1,02 (t, 3H, CH₂CH₃), 1,13 (s, 9H, tBu), 1,20 (t, 3H, CH-CH₃), 2,57 (m, 2H, CH₂-COOEt), 3,64 (d, 2H, CH₂φ), 3,84 à 3,95 (m, 3H, CH₃-CH₂ et CH₃-CH), 4,47 (q, 1H, CH-CH₂-COOEt) 4,51 (s, 1H, SO₂NH), 7,11 à 7,35 (m, 2φ, 10H), 7,39 (dd, 1H, aromatique), 7,51 (d, 1H, aromatique), 7,71 (d, 1H, aromatique), 7,90 (s, 1H, aromatique).

V-B) 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) phényl) 3-((S)-N-benzyl-1-phényléthylamino) propanoate d'éthyle

Le composé analogue de configuration (3S) est obtenu par le même protocole en utilisant la (R) (-) N-benzyl-1-phényléthylamino) propanoate d'éthyle.

VI-A) (3R) 3-(N-t-butoxycarbonyl-amino)-, 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) phényl) propanoate d'éthyle

3,28 g (6,28 mmol) de (3R) 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) phényl) 3-((S)-N-benzyl phényléthylamino) propanoate d'éthyle et 4,8 g (22 mmol) de Boc₂O sont solubilisés dans 60 ml d'acétate d'éthyle contenant 4,4 g Pd(OH)₂ /C (20%). La solution est vigoureusement agitée en présence de 20 bars d'hydrogène à 25 °C pendant 18 heures. Après élimination du catalyseur par filtration sur célite, le filtrat est évaporé sous pression réduite et purifié sur colonne de silice (AcOEt/cyclohexane, 1/3)

pour obtenir avec un rendement de 85% 2,28g de (3R) 3-(N-t-butoxycarbonyl-amino)-, 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl)phényl) propanoate d'éthyle dont les caractéristiques sont les suivantes.

5 Rf (AcOEt/cyclohexane, 3/7) = 0,21
1H RMN (CDCl3) δ 1,13 (t, 3H, CH₂CH₃), 1.15 (s, 9H, tBu-NH-SO₂ -), 1.35 (s, 9H, Boc), 2,76 (d, 2H, CH₂-COOEt), 3,99 (q, 2H, CH₃-CH₂), 4,60 (s, 1H, SO₂NH), 5,08 (m, 1H, CH-CH₂-COOEt), 5,58 (d, 1H, NH-Boc), 7,38 (dd, 1H, aromatique), 7,40 (d, 1H, aromatique) 7,72 (d, 1H, aromatique),
10 7,77 (s, 1H, aromatique).

VI-B) (3S), 3-(N-t-butoxycarbonyl-amino)-, 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl) phényl) propanoate d'éthyle

15 Le composé analogue de configuration (3S) est obtenu par le même protocole à partir du composé décrit en (V-B) (Synthon 3).

VII-A) (2S,3S) 2-(paraméthoxybenzyl-thio)-, 3-(N-t-butoxycarbonyl-amino)-, 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl)phényl) propanoate d'éthyle

20 Sous azote, 0,5 g (1,17 mmol) d'ester (3R) 3-(N-t-butoxycarbonyl-amino)-, 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl)phényl) propanoate d'éthyle est dissous dans 10 ml de THF. A -78°C, 1,9 ml de LDA (2M/ heptane/THF/ethylbenzene; 3,8 mmol) sont ajoutés goutte à goutte. Après 30 minutes, on ajoute à -78°C 0,5 g (1,4 mmol) de disulfure de paraméthoxybenzyle et 2,4 dinitrophenyle (préparé selon Bischoff et al., (1997) J.Org.Chem., 62(14), p 4848-4850), et la solution est agitée pendant 2 heures à -78°C. On ajoute KHSO₄ (1N), on extrait avec AcOEt ; les phases organiques sont lavées par KHSO₄(1N), NaCl saturée, séchées sur Na₂SO₄ puis évaporées sous pression réduite.

30 Après purification sur colonne de silice (AcEt/cyclohexane 1/3), on obtient avec un rendement de 49%, 331 mg de (2S,3S) 2-(paraméthoxybenzyl-thio)-, 3-(N-t-butoxycarbonyl-amino)-, 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl)phényl) propanoate d'éthyle dont les caractéristiques sont les suivantes. L'excès énantiomérique est supérieur à 95 % comme en témoigne l'analyse HPLC et la RMN.

Rf (AcOEt/cyclohexane, 3/7) = 0,31

^1H RMN (CDCl_3) δ 1,08 (t, 3H, CH_2CH_3), 1,12 (s, 9H, tBu-NH-SO_2 -), 1,36 (s, 9H, Boc), 3,40 (d, 1H, CH-COOEt), 3,75 (s, 3H et 2H, OMe et $\phi\text{-CH}_2\text{-S}$), 3,96 (q, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 4,51 (s, 1H, SO_2NH), 5,00 (m, 1H, BocNH-CH), 6,11 (d, 1H, NH-Boc), 6,82 (d, 2H, $\phi\text{-OMe}$), 7,22 (d, 2H, $\phi\text{-OMe}$), 7,25 (d, 1H, aromatique), 7,30 (t, 1H, aromatique), 7,50 (s, 1H, aromatique), 7,68 (d, 1H, aromatique).

VII-B) (2R, 3R), 2-(paraméthoxybenzyl-thio)-, 3-(N-t-butoxycarbonyl-amino)-, 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl)phényl) propanoate d'éthyle

Le composé analogue de configuration (2R, 3R) est obtenu par le même protocole à partir du composé décrit en (VI-B) (Synthon 3).

VIII-A) acide (2SR,3S), 2-(paraméthoxybenzyl-thio)-, 3-(N-t-butoxycarbonylamino)-, 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl)phényl) propanoïque.

A 0,33 g (0,57 mmole) de (2S,3S) 2-(paraméthoxybenzyl-thio)-, 3-(N-t-butoxycarbonyl-amino)-, 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl)phényl) propanoate d'éthyle dans 2,5 ml d'éthanol, on ajoute 2,5 ml de NaOH (2N). En suivant les conditions opératoires décrites dans l'exemple (Synthon 1) BIV, on obtient avec un rendement de 98%, 310 mg d'acide (2SR,3S), 2-(paraméthoxybenzyl-thio)-, 3-(N-t-butoxycarbonyl-amino)-, 3-(3-(N-tertiobutylamino sulfonyl)phényl) propanoïque dont les caractéristiques sont les suivantes :

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOOH}$, 96/3/1) = 0,16

^1H RMN (CDCl_3) (deux diastéréoisomères A et B) δ 1,11 (A) et 1,12 (B) (s, 9H, tBu-NH-SO_2 -), 1,30 (A) et 1,35 (B) (s, 9H, Boc), 3,40 (A) et 3,45 (B) (d, 1H, CH-COOEt), 3,72 et 3,75 (A+B) (s, 3H et 2H, OMe et $\phi\text{-CH}_2\text{-S}$), 3,65 (s, 1H, SO_2NH), 5,05 (A) et 5,32 (B) (m, 1H, BocNH-CH), 5,37 (A) et 6,20 (B) (d, 1H, NH-Boc), 6,75 (A) et 6,80 (B) (d, 2H, $\phi\text{-OMe}$), 7,12 (A) et 7,20 (B) (d, 2H, $\phi\text{-OMe}$), 7,30 (A+B) (d, 1H, aromatique), 7,40 (A+B) (t, 1H, aromatique), 7,81 (B) et 7,70 (A) (s, 1H, aromatique), 7,68 (A) et 7,75 (B) (d, 1H, aromatique).

VIII-B) (2SR, 3R), 2-(paraméthoxybenzyl-thio)- 3-(N-t-butoxy-carbonylamino)- 3-(3-(N-tertiobutylaminosulfonyl)phényl) propanoïque.

Le composé de configuration (2SR, 3R) est obtenu par le même protocole à partir du composé décrit en VII-B (Synthon 3).

EXEMPLE N° 1

N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanoyl)- L-Valyl)- L-Isoleucine

I-) H-Val-Ile-HMP-résine

La synthèse du dipeptidyl-résine H-Val-Ile-HMP-résine est réalisée en utilisant la procédure A sur 150 mg (0,15 mmol) de HMP-résine avec A₂ = Fmoc-Ile-OH et A₁ = Fmoc-Val-OH.

II-A) (2RS,3S), N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanoyl)- L-Valyl)- L-Isoleucine

A 135 mg (250 µmol) d'acide (2RS, 3S), 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoïque (Synthon 1A), 122 mg (320 µmol) de HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate), 150 µmol de H-Val-Ile-HMP-résine dans 5 ml de dichlorométhane est ajoutée, sous agitation à température ambiante, 200 µl de diisopropyléthylamine. La fin de la réaction est suivie par le test de Kaiser. Après 6 heures de réaction à cette température, la résine est lavée alternativement avec NMP (N-méthyl-pyrrolidone) et dichlorométhane.

On effectue une déprotection TFA avec le mélange TFA : eau : triisopropylsilane 40: 2: 1 pendant 3 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite, repris avec de l'eau puis lyophilisé.

On effectue dès lors une déprotection HF à 0°C avec le mélange HF : métacrésol 10:0,2 pendant 1 heure. Après distillation du HF, le résidu est repris avec un peu de TFA puis précipité avec un mélange

froid éther diéthylique : n-hexane 50:50. Le produit est ensuite lyophilisé. On obtient 100 mg de brut.

Le produit est purifié sur une colonne semi-préparative (Vydac C18 ref 218TP510, 20x250 mm). Les deux diastéréoisomères sont ainsi séparés.

HPLC (gradient 20% de B à 60% de B en 15 min; colonne Macherey-Nagel C18): 2 pics 8.9 et 9.4

SM (ES): (M+H)⁺ m/z = 441,1

¹H-RMN (D₂O) δ 0.90 (t, 3H, δCH₃(Ile)), 0.92 à 1.10 (m, 9H, γCH₃(Ile)// γCH₃(Val)/ γCH₃(Val)), 1.20 à 1.30 (m, 1H, γCH₂(Ile)), 1.42 à 1.53 (m, 1H, γCH₂(Ile)), 1.88 à 1.96 (m, 1H, βCH(Ile)), 2.06 à 2.14 (m, 1H, βCH(Val)) 2.22 à 2.32 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 3.39 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 3.82 (d, 1H, CH-SH), 3.88 (d, 1H, CH-CH₂-CH₂), 4.16 (m, 1H, αCH(Val)), 4.27 (d, 1H, αCH(Ile)).

II-B) (2RS,3R) N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanoyl)- L-Valyl)- L-Isoleucine

Les deux autres diastéréoisomères sont obtenus par le même protocole à partir du synthon 1 de configuration (2RS, 3R).

EXEMPLE N° 2

N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanoyl) - L-Valyl)- L-Isoleucyl- Benzylamide

I-) H-Val-Ile-NHBz

Le composé H-Val-Ile-NHBz est obtenu en phase liquide par condensation et déprotection successives du Boc-Ile-OH et du Boc-Val-OH sur la benzylamine. Ce composé présente les caractéristiques suivantes :

¹H RMN (d₆-DMSO) δ 0.80 (t, 3H, δCH₃(Ile)), 0.82 (d, 3H, γCH₃(Val)), 0.84 (d, 3H, γCH₃(Ile)), 0.86 (d, 3H, γCH₃(Val)), 0.99 à 1.11 (m, 1H,

$\gamma\text{CH}_2(\text{Ile})$), 1.40 à 1.52 (m, 1H, $\gamma\text{CH}_2(\text{Ile})$), 1.60 à 1.65 (m, 1H, $\beta\text{CH}(\text{Ile})$), 1.93 à 2.08 (m, 1H, $\beta\text{CH}(\text{Val})$), 3.65 (dd, 1H, $\alpha\text{CH}(\text{Ile})$), 4.11 à 4.20 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.31 (dd, 1H, $\alpha\text{CH}(\text{Val})$), 7.20 (m, 5H, aromatiques), 8.03 (s, 3H, NH_3^+), 8.38 (d, 1H, $\text{NH}(\text{Ile})$), 8.60 (t, 1H, $\text{NH-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$)

II-A) (2RS,3S), N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanoyl) - L-Valyl)- L-Isoleucyl- Benzylamide

A 269 mg (500 μmol) d'acide (2RS, 3S), 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertbutylaminosulfonyl) pentanoïque (dont la synthèse est détaillée dans la procédure 2), 380 mg (1 mmol) de HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-yl)1.1.3.3-tetramethyluronium hexafluorophosphate), 192 mg (600 μmol) de H-Val-Ile-NHBz dans 5 ml de dichlorométhane est ajouté, sous agitation à température ambiante, 305 μl de diisopropyléthylamine.

Après 6 heures de réaction à cette température, on évapore le dichlorométhane sous pression réduite. On reprend le résidu avec de l'AcOEt ; les phases organiques combinées sont lavées avec NaHCO_3 (10%), KHSO_4 (1N), une solution saturée de NaCl. Après avoir séché sur Na_2SO_4 puis évaporée sous pression réduite, on effectue une déprotection TFA avec le mélange TFA : eau : triisopropylsilane 40: 2: 1 pendant 3 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite, repris avec de l'eau puis lyophilisé.

On effectue des lors une déprotection HF à 0°C avec le mélange HF : métacrésol 10:0,2 pendant 1 heure. Après distillation du HF, le résidu est repris avec un peu de TFA puis précipité avec un mélange froid éther diéthylique : n-hexane 50:50. Le produit est ensuite lyophilisé. On obtient 460 mg de brut.

Le produit est purifié sur une colonne semi-préparative (Vydac C18 ref 218TP510, 20x250 mm). Les deux diastéréoisomères ne sont pas séparés.

HPLC (gradient 40% de B à 80% de B en 15 min; colonne Macherey-Nagel C18): un seul pic à 8.6 min

$^1\text{H-RMN}$ ($\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 0.75 à 0.85 (m, 12H, $\gamma\text{CH}_3(\text{Ile})/\delta\text{CH}_3(\text{Ile})/\gamma\text{CH}_3(\text{Val})/\gamma\text{CH}_3(\text{Val})$), 0.96 à 1.07 (m, 1H, $\gamma\text{CH}_2(\text{Ile})$), 1.35 à 1.45 (m, 1H, $\gamma\text{CH}_2(\text{Ile})$), 1.62 à 1.72 (m, 1H, $\beta\text{CH}(\text{Ile})$), 1.90 à 2.10 (m, 3H, $\beta\text{CH}(\text{Val})$)

CH-CH₂-CH₂), 2.94 à 3.07 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 3.47 et 3.57 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 3.83 et 3.87 (d, 1H, CH-SH), 4.13 (m, 1H, αCH(Ile)), 4.17 et 4.24 (m, 2H, CH₂-C₆H₅), 4.28 (m, 1H, αCH(Val)), 6.69 et 6.71 (s, 2H, SO₂NH₂), 7.15 à 7.25 (m, 5H, CH₂-C₆H₅), 8.02 et 8.09 (d, 1H, NH(Ile)), 8.34 et 8.38 (d, 1H, NH(Val)), 8.48 et 8.52 (t, 1H, NH-CH₂-C₆H₅)

¹H-RMN (D₂O) δ 0.84 à 0.97 (m, 12H, γCH₃(Ile)/ δCH₃(Ile)/ γCH₃(Val)/ γCH₃(Val)), 1.16 à 1.23 (m, 1H, γCH₂(Ile)), 1.47 à 1.56 (m, 1H, γCH₂(Ile)), 1.82 à 1.88 (m, 1H, βCH(Ile)), 2.02 à 2.08 (m, 1H, βCH(Val)), 2.22 à 2.28 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 3.33 à 3.41 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 3.78 (m, 1H, CH-SH), 3.79 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 4.10 (d, 1H, αCH(Val)), 4.12 (d, 1H, αCH(Ile)), 4.40 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 7.29 à 7.41 (m, 5H, CH₂-C₆H₅)
SM (ES): (M+H)⁺ m/z = 530,2

II-B)

Les deux autres diastéréoisomères sont obtenus par le même protocole à partir du synthon 1 de configuration (2RS, 3R).

EXEMPLE N° 3

N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanoyl)- L-Tyrosyl)- L-Histidine

I-) H-Tyr(tBu)-His(Trt)-dichlorotritylrésine

La synthèse du dipeptidyl-résine H-Tyr(tBu)-His(Trt)-dichlorotritylrésine est réalisée en utilisant la procédure 1 sur 125 mg (168 μmol) de dichlorotritylrésine avec A₂ = Fmoc-His(Trt)-OH et A₁ = Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

II-A) (2RS,3S), N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanoyl)- L-Tyrosyl)- L-Histidyl-OH

A 135 mg (250 μmol) d'acide (2RS, 3S), 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoïque (dont la synthèse est détaillée dans la procédure 2), 140 mg (320 μmol) de BOP, 168 μmol de H-Tyr(tBu)-

His(Trt)-dichlorotriylrésine dans 5 ml de dichlorométhane, est ajouté, sous agitation à température ambiante, 200 μ l de diisopropyléthylamine. La fin de la réaction est suivie par le test de Kaiser. Après 6 heures de réaction à cette température, la résine est lavée alternativement avec NMP et dichlorométhane.

Le peptide est clivé de la résine par traitement avec le mélange trifluoroéthanol : dichlorométhane 2:8 (20 ml).

On effectue une déprotection TFA avec le mélange TFA : eau : triisopropylsilane 40 ml: 2 ml: 1 ml pendant 3 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite, repris avec de l'eau puis lyophilisé.

On effectue dès lors une déprotection HF à 0°C avec le mélange HF : métacrésol 10 ml:0,2 ml pendant 1 heure. Après distillation du HF, le résidu est repris avec un peu de TFA puis précipité avec un mélange froid éther diéthylique : n-hexane 50:50. Après centrifugation, le culot est repris avec de l'eau puis lyophilisé. On obtient 100 mg de brut.

Le produit est purifié sur une colonne semi-préparative (Vydac C18 ref 218TP510, 20x250 mm). Les deux diastéréoisomères sont ainsi séparés.

HPLC (gradient 0% de B à 40% de B en 15 min; colonne Macherey-Nagel C18): 2 pics 10.6 min et 11.5 min

SM (ESI): (M+H)⁺ m/z = 529,1 et 2+ 265,2

II-B) (2RS,3R) N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanóyl)- L-Tyrosyl)- L-Histidine

Les deux autres diastéréoisomères sont préparés par le même protocole à partir du synthon 1 de configuration (2RS, 3R).

EXEMPLE N° 4

N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanoyl)-L-Tyrosyl)-L-Histidyl-NHBz.

5 I-) H-Tyr(tBu)-His(Trt)-NHBz

10 H-Tyr(tBu)-His(Trt)-NHBz dont les caractéristiques sont les suivantes est obtenu en phase liquide par condensations et déprotections successives du Fmoc-His(Trt)-OH et du Fmoc-Tyr(tBu)-OH sur la benzylamine, en utilisant les protocoles connus de l'homme de l'art.

15 ^1H RMN ($\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 1.20 (s, 9H, Trt), 2.40 (dd, 1H, $\beta\text{CH}_2(\text{His})$ / $\beta\text{CH}_2(\text{Tyr})$), 2.80 (dd, 2H, $\beta\text{CH}_2(\text{His})$ / $\beta\text{CH}_2(\text{Tyr})$), 3.30 (m, 1H, $\alpha\text{CH}(\text{His})$), 4.17 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.48 (m, 1H, $\alpha\text{CH}(\text{His})$), 6.60 (s, 1H, His), 6.77 (d, 2H, H_3 H_5 (Tyr)), 6.95 (d, 2H, H_2 H_6 (Tyr)), 7.00 à 7.33 (m, 20H, C_6H_5 / Trityl), 8.12 (d, 1H, $\text{NH}(\text{His})$), 8.30 (t, 1H, $\text{NH-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 8.52 (d, 2H, $\text{NH}_2(\text{Tyr})$).

20 II-A) (2RS,3S), N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl, pentanoyl)-L-Tyrosyl)-L-Histidyl-NHBz.

25 239 mg (444 μmol) d'acide (2RS, 3S), 2-(paraméthoxybenzylthio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoïque (dont la synthèse est détaillée dans la procédure 2) sont condensés sur 367 mg (533 μmol) de H-Tyr(tBu)-His(Trt)-NHBz dans 5 ml de dichlorométhane selon le mode opératoire décrit dans l'exemple n°2 étape II. Après déprotection, on obtient 460 mg de brut qui est purifié sur une colonne semi-préparative (Vydac C18 ref 218TP510, 20x250 mm). Les deux diastéréoisomères sont séparés.

30 HPLC (gradient 20% de B à 60% de B en 15 min ; colonne Macherey-Nagel C18): 2 pics à 9.5 min et 9.9 min.

35 ^1H RMN (D_2O) δ 2.12 (m, 2H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.96 (dd, 2H, $\beta(\text{Tyr})$), 3.08 (dd, 1H, $\beta(\text{His})$), 3.18 (dd, 1H, $\beta(\text{His})$), 3.33 (t, 2H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.70 (d, 1H, CH-SH), 3.72 (m, 1H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2$), 4.22 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.37 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.55 (t, 1H, $\alpha(\text{Tyr})$), 4.60 (t, 1H, $\alpha(\text{His})$), 6.82 (d, 2H,

H₃-H₅(Tyr)), 7.13 (d, 2H, H₂-H₆(Tyr)), 7.14 (s, 1H, H₄(His)), 7.19 (d, 2H, C₆H₅), 7.37 (m, 3H, C₆H₅), 8.51 (s, 1H, H₂(His)).

SM (ESI): (M+H)⁺ m/z = 618,1

5 II-B) (2RS,3R) N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl, pentanoyl)-L-Tyrosyl)-L-Histidyl-NHBz.

Les deux autres diastéréoisomères sont préparés par le même protocole à partir du synthon 1 de configuration (2RS, 3R).

10

EXEMPLE N°5

N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentyl)-L-Tyrosyl)-L-Histidine

15

I-A) (2RS,3S), 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanol

A une solution de 284 mg (0,51 mmol) de (2SR,3S), 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanoate de méthyle dans 2 ml de THF et 2 ml d'éthanol absolu, sont ajoutés 90 mg (2,1 mmol) de chlorure de lithium et 80 mg (2,1 mmol) de borohydrure de sodium (NaBH₄). La réaction est agitée pendant 18 heures à température voisine de 20°C. Elle est arrêtée en additionnant KHSO₄(1N) et extraite avec de l'AcEt. Les phases organiques sont lavées avec de l'eau, KHSO₄(1N), NaHCO₃(10%), une solution de NaCl saturée, séchées sur Na₂SO₄(1N) puis concentrées sous pression réduite.

On obtient avec un rendement quantitatif, 270 mg de (2SR,3S), 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanol dont les caractéristiques sont les suivantes :

¹H RMN (d₆ - DMSO) δ 1,18 (s, 9H, tBu), 1,60 à 1,72 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1,82 à 1,97 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2,89 (t, 2H, CH-CH₂-CH₂), 3,20 à 3,30 (m, 2H, CH₂OH), 3,49 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 4,70 (t, 1H, CH₂OH), 4,96 (d, 2H, CH₂C₆H₅), 6,73 (s, 1H, SO₂NH), 7,10 (d, 1H, ZNH), 7,28 (s, 5H, CH aromatiques)

I-B) (2RS,3R) 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanol

Le composé analogue de configuration (2RS, 3R) est obtenu par le même protocole à partir du synthon 1 sous forme d'ester méthylique et de configuration (2SR, 3R).

II-A) (2SR,3S), 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanal

A une solution de 0,056 ml (0,63) mmol) de chlorure d'oxaly (fraîchement distillé) dans 2,5 ml de dichlorométhane, est ajoutée goutte à goutte, à -78°C, sous azote, une solution de 0,115 ml (1,6 mmol) de DMSO dans 0,5 ml de dichlorométhane. Une solution de 270 mg de (2SR,3S), 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanol dans 1,5 ml de CH₂Cl₂ est coulée goutte à goutte. L'agitation est maintenue pendant 30 minutes, puis on ajoute 375 µl de triéthylamine. Le mélange réactionnel est agité pendant 5 minutes supplémentaire à -65°C puis on laisse revenir le bain à température ambiante.

Après 1 h d'agitation, on ajoute de l'eau et la phase aqueuse est extraite au dichlorométhane. Les phases organiques sont combinées, lavées avec KHSO₄(1N), NaHCO₃(10%), NaCl saturée, séchées sur Na₂SO₄.

Après concentration sous pression réduite, on obtient avec un rendement de 94%, 0,747 g de (2SR,3S), 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanal dont les caractéristiques sont les suivantes :

¹H RMN (d₆ - DMSO) δ (s, 9H, tBu), 1,80 à 1,92 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2,05 à 2,18 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2,86 à 3,02 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 4,03 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 5,00 (s, 1H, CH₂C₆H₅), 6,87 (s, 1H, SO₂NH), 7,27 à 7,37 (m, 5H, CH aromatiques), 7,87 (d, 1H, ZNH), 9,45 (s, 1H, CHO)

II-B) (2RS,3R) 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanal

Le composé analogue de configuration (2SR, 3S) est obtenu par le même protocole à partir du composé décrit en IB.

III-) H-Tyr(tBu)-His(Trt)-HMPrésine

La synthèse du dipeptidyl-résine H-Tyr(tBu)-His(Trt)-HMPrésine est réalisée en utilisant la procédure 1 sur 150 mg (0,15mmol) de HMP-résine avec A₂ = Fmoc-His(Trt)-OH et A₁ = Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

IV-) (2 SR, 3S) N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentyl)-L-Tyrosyl)-L-Histidine

A une solution de 200 mg (0,4 mmol) de (2SR,3S) 3-(N-Z), 2-(paraméthoxybenzyl-thio), 3-(N-benzyloxycarbonyl-amino), 5-(N-tertiobutylaminosulfonyl) pentanal, 150 µmol de résine H-Tyr(tBu)-His(Trt)-HMPrésine, 30 mg (0,16 mmol) d'acide paratoluènesulfonique (APTS) dans 6 ml de DMF, est ajoutée une solution de 25 mg de NaBH₃CN dans 1 ml de DMF. Le mélange réactionnel est agité pendant 16 heures à température ambiante. La résine est lavée alternativement avec NMP et dichlorométhane. On effectue une déprotection TFA avec le mélange TFA : eau : triisopropylsilane 40 ml: 2 ml: 1ml pendant 3 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite, repris avec de l'eau puis lyophilisé.

On effectue dès lors une déprotection HF à 0°C avec le mélange HF : métacrésol 10 ml: 0,2 ml pendant 1 heure. Après distillation du HF, le résidu est repris avec un peu de TFA puis précipité avec un mélange froid éther diéthylique : n-hexane 50:50. Le produit est ensuite lyophilisé.

Les deux diastéréoisomères obtenus sont purifiés et séparés sur une colonne semi-préparative.

Les deux autres diastéréoisomères sont obtenus par le même protocole à partir du synthon 1 de configuration (2RS, 3R).

HPLC (gradient 0% à 40% de B en 15 min ; colonne Macherey-Nagel C18) : 4 pics à 10.80, 10.90, 11.03 et 11.14 min.

SM(ES): $(M+H)^+$ $m/z = 515.2$; $(M+2H)^{2+}$ $m/z = 258.1$

5 EXEMPLE N° 6

N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 3-(3-sulfamoyl)phényl propanoyl)- L-Tyrosyl)- L-Histidyl-benzylamide.

10 I-) H-Tyr(tBu)-His(Trt)-NHBz

15 H-Tyr(tBu)-His(Trt)-NHBz dont les caractéristiques sont les suivantes est obtenu en phase liquide par condensations et déprotections successives du Fmoc-His(Trt)-OH et du Fmoc-Tyr(tBu)-OH sur la benzylamine.

15 ^1H RMN (d_6 -DMSO) δ 1.20 (s, 9H, Trt), 2.40 (dd, 1H, $\beta\text{CH}_2(\text{His})$ / $\beta\text{CH}_2(\text{Tyr})$), 2.80 (dd, 2H, $\beta\text{CH}_2(\text{His})$ / $\beta\text{CH}_2(\text{Tyr})$), 3.30 (m, 1H, $\alpha\text{CH}(\text{His})$), 4.17 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.48 (m, 1H, $\alpha\text{CH}(\text{His})$), 6.60 (s, 1H, His), 6.77 (d, 2H, H_3 H_5 (Tyr)), 6.95 (d, 2H, H_2 H_6 (Tyr)), 7.00 à 7.33 (m, 20H, C_6H_5 / Trityl), 8.12 (d, 1H, $\text{NH}(\text{His})$), 8.30 (t, 1H, $\text{NH-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 8.52 (d, 2H, $\text{NH}_2(\text{Tyr})$).

20 II-A) (2RS,3S), N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 3-(3-sulfamoyl)phényl propanoyl)- L-Tyrosyl)- L-Histidyl-benzylamide.

25 300 mg (0,57 mmol) d'acide (2SR,3S), 2-(paraméthoxybenzyl-thio)-, 3-(N-t-butoxycarbonyl-amino)-, 3-(3-(N-tertibutylaminosulfonyl)phényl) propanoïque (dont la synthèse est détaillée dans la procédure 2 BIII) sont condensés sur 470 mg (0,68 mmol) de H-Tyr(tBu)-His(Trt)-NHBz dans 5 ml de dichlorométhane selon le mode opératoire décrit dans l'exemple n°2 étape II. Après déprotection par l'acide trifluoroacétique, on obtient 460 mg de brut qui est purifié sur une colonne semi-préparative (Vydac C18 ref 218TP510, 20x250 mm). Les deux diastéréoisomères sont séparés à ce niveau là de la synthèse par HPLC sur une colonne Vydac C18 10X250 mm.

35 HPLC (gradient 10% de B à 90% de B en 30 min ; colonne Macherey-Nagel C18) : 2 pics à 12,85 min et 14,35 min (débit 1,5 ml/min).

Les deux produits obtenus sont alors traités à l'acide fluorhydrique anhydre en présence de 2% m-crésol afin de déprotéger le groupe p-méthoxy benzyl protégeant le soufre puis repurifiés par HPLC.

5 ^1H RMN (D_2O) δ 2.96 (dd, 2H, $\beta(\text{Tyr})$), 3.08 (dd, 1H, $\beta(\text{His})$), 3.18 (dd, 1H, $\beta(\text{His})$), 3.70 (d, 1H, CH-SH), 4.22 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.37 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.55 (t, 1H, $\alpha(\text{Tyr})$), 4.60 (t, 1H, $\alpha(\text{His})$), 6.82 (d, 2H, $\text{H}_3\text{-H}_5(\text{Tyr})$), 7.13 (d, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6(\text{Tyr})$), 7.14 (s, 1H, $\text{H}_4(\text{His})$), 7.19 (d, 2H, C_6H_5), 7.37 (m, 3H, C_6H_5), 8.51 (s, 1H, $\text{H}_2(\text{His})$).
10 SM (ESI): $(\text{M}+\text{H})^+$ m/z 666,2

II-B) N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 3-(3-sulfamoyl)phényl propanoyl)- L-Tyrosyl)- L-Histidyl-benzylamide.

15 Les deux autres diastéréoisomères sont obtenus par le même protocole à partir du synthon 3 de configuration (2RS, 3R).

EXEMPLE N°7

20 N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-carbamoyl pentanoyl)-L- β (2-naphtyl)-Ala)-L- β (2-naphtyl)-Alanine

I-) H- β (2-naphtyl)-L-Ala- β (2-naphtyl)-L-Ala-dichlorotritylrésine

25 La synthèse du dipeptidyl-résine H- β (2-naphtyl)-L-Ala- β (2-naphtyl)-L-Ala-dichlorotritylrésine est réalisée en utilisant la procédure 1 sur 125 mg (200 μmol) de dichlorotritylrésine avec A_1 et $\text{A}_2 = \text{Fmoc-}\beta$ (2-naphtyl)-L-Ala-OH.

30 II-A) (2RS,3S) N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-carbamoyl, pentanoyl)-L- β (2-naphtyl)-Ala)-L- β (2-naphtyl)-Alanine

35 200 mg (300 μmol) d'acide (2RS, 3S), 2-(paraméthoxybenzylthio), 3-(N-Boc), 5-trityl-carbamoyl pentanoïque (dont la synthèse est détaillée dans la procédure 3) sont condensés sur 200 μmol de H- β (2-naphtyl)-L-Ala- β (2-naphtyl)-L-Ala-dichlorotritylrésine dans 5 ml de dichlorométhane en suivant le mode opératoire décrit dans l'exemple n°3 étape II. Après déprotection, on obtient 149 mg de brut qui est purifié sur

une colonne semi-préparative (Vydac C18 ref 218TP510, 20x25 mm). Les deux diastéréoisomères obtenus sont ainsi séparés.

5 HPLC (gradient de 40% à 80% de B en 15 min ; colonne Interchrom®) : 2 pics à 12.3 min et 13.2 min.

¹H RMN (d₆-DMSO) δ 1.18 (m, 1H, βCH₂(Gln)), 1.33 (m, 1H, βCH₂(Gln)), 1.87 (m, 2H, γCH₂(Gln)), 2.80 à 3.15 (m, 4H, βCH₂(β(2-naphtyl)-L-Ala)), 3.23 (m, 1H, αCH(Gln)), 3.52 (m, 1H, CH-SH), 4.54 et 4.67 (m, 2H, αCH((β(2-naphtyl)-L-Ala))/αCH((β(2-naphtyl)-L-Ala))), 7.00 (s, 1H, CONH₂(Gln)), 7.38 (s, 1H, CONH₂(Gln)), 7.38 à 7.85 (m, 16 H, arom (β(2-naphtyl)-L-Ala)/NH₂(Gln)), 8.62 et 8.66 (d, 2H, NH(β(2-naphtyl)-L-Ala))
10 SM(ES) : (M+H)⁺ = 586,22

15 II-B) (2RS,3R) N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-carbamoyl, pentanoyl)-L-β(2-naphtyl)-Ala)-L-β(2-naphtyl)-Alanine

Les deux autres diastéréoisomères sont obtenus par le même protocole à partir du synthon 2 de configuration (2RS, 3R).

20 EXEMPLE N°8

N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-carbamoyl pentanoyl)-L-Trp)-L-Leucine

25 L)-H-Trp-Leu-OtBu

H-Trp-Leu-OtBu dont les caractéristiques sont les suivantes est obtenu par condensation du Fmoc-Trp-OH sur la H-Leu-OtBu suivie par une déprotection.

30 R_f (MeOH:dichlorométhane 10:90)=0,30

¹H RMN (d₆-DMSO) δ 0.75(d, 3H, δCH₃(Leu)), 0.81 (d, 3H, δCH₃(Leu)), 1.35 (s, 9H, tBu), 1.42 (m, 1H, γCH(Leu)), 1.63 (m, 2H, βCH₂(Leu)), 2.68 (dd, 1H, βCH₂(Trp)), 3.01 (dd, 1H, βCH₂(Trp)), 3.43 (m, 1H, αCH(Leu)), 4.15 (m, 1H, αCH(Trp)), 6.91 (t, 1H, H₅(Trp)), 7.00 (t, 1H, H₆(Trp)), 7.01 (d, 1H, H₂(Trp)), 7.27 (d, 1H, H₇(Trp)), 7.51 (d, 1H, H₄(Trp)), 8.00 (d, 1H, NH(Leu)), 10.79 (s, 1H, NH(Trp))
35

II-A) (2RS, 3S), N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-carbamoyl pentanoyl)-L-Trp)-L-Leucine

200 mg (300 μ mol) d'acide (2RS, 3S), 2-(paraméthoxybenzylthio), 3-(N-Boc), 5-trityl-carbamoyl pentanoïque (dont la synthèse est détaillée dans la procédure 3) sont condensés sur 200 μ mol de H-Trp-Leu-OtBu dans 5 ml de dichlorométhane en utilisant le mode opératoire décrit dans l'exemple n°2, étape II.

Après déprotection, on obtient 223 mg de brut qui sont purifiés sur une colonne semi-préparative (Vydac C18 ref 218TP510, 20x25 mm). Les deux diastéréoisomères obtenus sont ainsi séparés.

^1H RMN (d_6 -DMSO) δ 0.83 (δ , 3H, $\delta\text{CH}_3(\text{Leu})$), 0.88 (d , 3H, $\delta\text{CH}_3(\text{Leu})$), 1.32 (m , 1H, $\gamma\text{CH}(\text{Leu})$), 1.50 (m , 3H, $\beta\text{CH}_2(\text{Leu})/\beta\text{CH}_2(\text{Gln})$), 1.60 (m , 1H, $\beta\text{CH}_2(\text{Gln})$), 2.01 (t , 2H, $\gamma\text{CH}_2(\text{Gln})$), 2.91 (dd , 1H, $\beta\text{CH}_2(\text{Trp})$), 3.07 à 3.17 (m , 2H, $\beta\text{CH}_2(\text{Trp})/\alpha\text{CH}(\text{Gln})$), 3.63 (m , 1H, CH-SH), 4.27 (m , 1H, $\alpha\text{CH}(\text{Leu})$), 4.64 (m , 1H, $\alpha\text{CH}(\text{Trp})$), 6.97 (t , 1H, $\text{H}_5(\text{Trp})$), 6.99 (s , 1H, CONH_2), 7.03 (t , 1H, $\text{H}_6(\text{Trp})$), 7.13 (t , 1H, $\text{H}_2(\text{Trp})$), 7.32 (d , 1H, $\text{H}_7(\text{Trp})$), 7.40 (s , 1H, CONH_2), 7.63 (d , 1H, $\text{H}_4(\text{Trp})$), 7.95 (br s , 3H, NH_3^+), 8.40 (d , 1H, $\text{NH}(\text{Leu})$), 8.63 (d , 1H, $\text{NH}(\text{Trp})$), 10.76 (s , 1H, $\text{NH}_1(\text{Trp})$), 12.5 (br s , 1H, COOH).

II-B) (2RS, 3R) N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-carbamoyl pentanoyl)-L-Trp)-L-Leucine

Les deux autres diastéréoisomères sont obtenus par le même protocole à partir du synthon 2 de configuration (2RS, 3R).

EXEMPLE 9

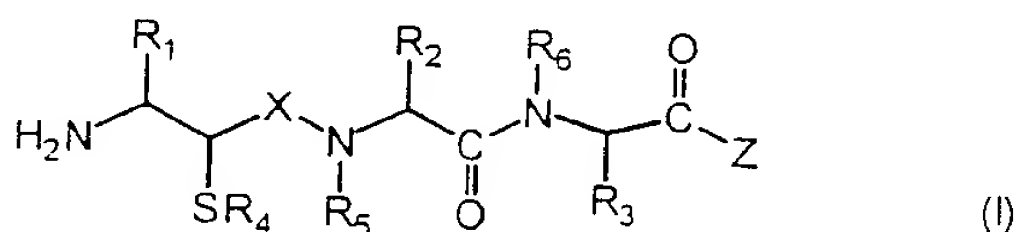
Caractérisation de l'activité biologique de composés de formule générale (I)

Le pouvoir inhibiteur peut être déterminé sur l'activité endopeptidasique des chaînes légères purifiées de toxine tétanique et de toxine botulique de type B en suivant le protocole décrit dans la littérature

(Soleilhac et al, Analytical Biochemistry, 241, 120, 1996) car ces deux enzymes clivent toutes deux la synaptobrevine au même site de clivage.

Le composé à tester (10 μ l) est préincubé avec 10 μ l de chaîne légère purifiée de toxine tétanique (250 ng) ou de toxine botulique B pendant 30 minutes à 37°C dans un volume total de 80 μ l de tampon 20mM Hépes, 100 mM NaCl à pH 7,4. On ajoute alors 20 μ l d'une solution à 100 μ M du substrat fluorescent (Pya⁸⁸)Syb 39-88 dans le même tampon ; l'incubation est prolongée pendant 30 minutes à 37°C et à l'abris de la lumière. On arrête la réaction par addition de 0,9 ml de 72% de MeOH dans l'eau contenant 0,1% de TFA. Le métabolite fluorescent généré (Pya⁸⁸)Syb 77-88 est séparé du substrat total par chromatographie sur colonne Sep-Pak Vac C18 contenant 500 mg de phase inverse C18 (Waters)®. La quantité de métabolite formée est mesurée par fluorimétrie avec comme longueur d'onde d'excitation 343 nm et comme longueur d'onde d'émission 377 nm.

A titre d'exemples, le tableau I ci-après donne l'activité inhibitrice *in vitro* de certains composés sur les propriétés hydrolytiques de la toxine tétanique.



(R₄, R₅, R₆ = Hydrogène)

En ce qui concerne le tableau II, y sont soumises les activités inhibitrices de certains composés revendiqués, sur les propriétés hydrolytiques de la toxine botulique de type B.

Tableau I :

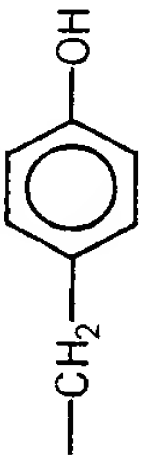
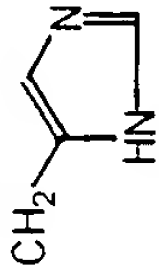
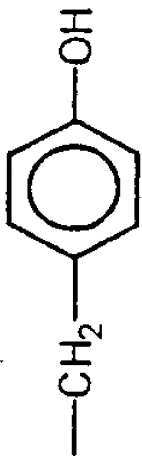
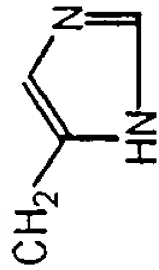

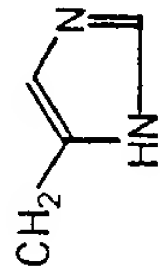

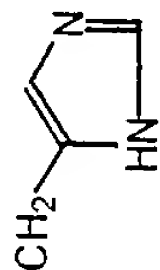


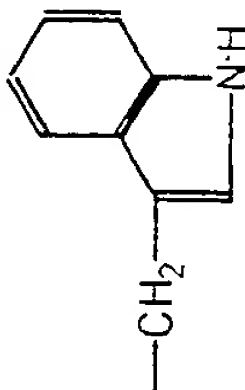
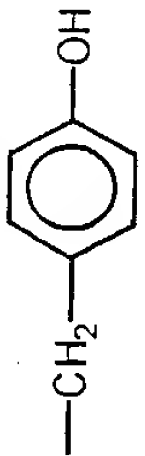
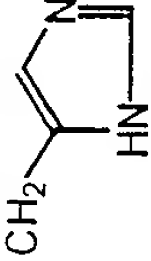
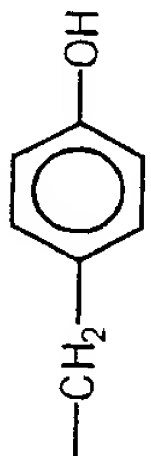
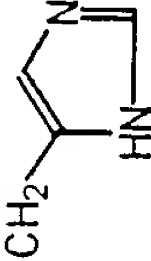
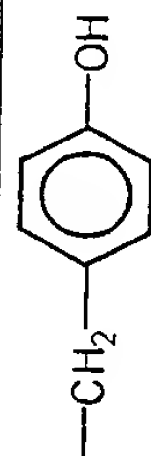
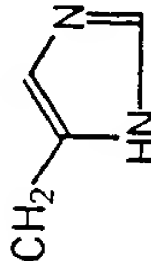

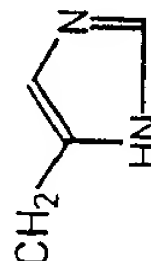
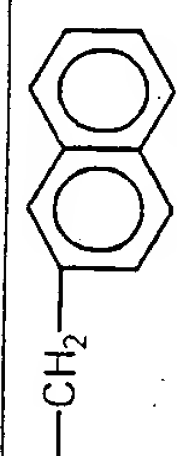
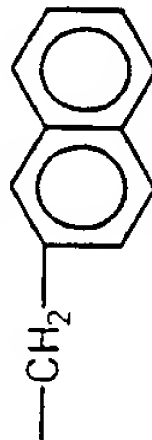
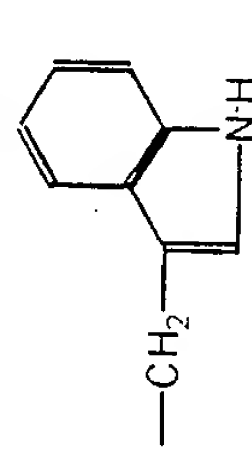
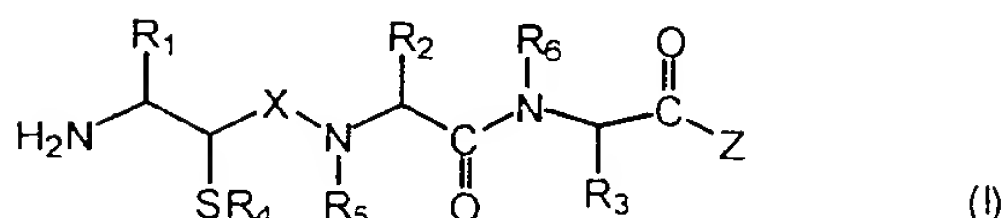
| N° | R ₁ | X | R ₂ | R ₃ | Z | Inhibition IC ₅₀ |
|----|---|-----------------|---|---|--------|-----------------------------|
| 1 | (CH ₂) ₂ SO ₂ NH ₂ | CO | -CH(CH ₃) ₂ | CH(CH ₃)(Et) | (OH) | 10 μM (2R, 3S) |
| 2 | (CH ₂) ₂ SO ₂ NH ₂ | CO | -CH(CH ₃) ₂ | CH(CH ₃)(Et) | (NHBz) | 8 μM (2R, 3S) |
| 3 | (CH ₂) ₂ SO ₂ NH ₂ | CO |  |  | (OH) | 5 μM (2R, 3S) |
| 4 | (CH ₂) ₂ SO ₂ NH ₂ | CO |  |  | (NHBz) | 3,5 μM (2R, 3S) |
| 5 | (CH ₂) ₂ SO ₂ NH ₂ | CH ₂ |  |  | (OH) | 50 μM (2(S,R), (3S, R) |
| 6 | m-(SO ₂ NH ₂)Ph | CO |  |  | (NHBz) | 3,5 μM (2R, 3R) |
| 7 | (CH ₂) ₂ CONH ₂ | CO |  |  | (OH) | 30 μM (2R, 3S) |
| 8 | (CH ₂) ₂ CONH ₂ | CO |  | CH ₂ -CH(CH ₃) ₂ | (OH) | 100 μM (2R, 3S) |

Tableau II

| N° | R ₁ | X | R ₂ | R ₃ | Z | Inhibition IC ₅₀ |
|----|---|-----------------|---|---|--------|-----------------------------|
| 1 | (CH ₂) ₂ SO ₂ NH ₂ | CO | -CH(CH ₃) ₂ | CH(CH ₃)(Et) | (OH) | 15 μM (2R, 3S) |
| 2 | (CH ₂) ₂ SO ₂ NH ₂ | CO | -CH(CH ₃) ₂ | CH(CH ₃)(Et) | (NHBz) | 10 μM (2R, 3S) |
| 3 | (CH ₂) ₂ SO ₂ NH ₂ | CO |  |  | (OH) | 8 μM (2R, 3S) |
| 4 | (CH ₂) ₂ SO ₂ NH ₂ | CO |  |  | (NHBz) | 5 μM (2R, 3S) |
| 5 | (CH ₂) ₂ SO ₂ NH ₂ | CH ₂ |  |  | (OH) | 25 μM (2(S,R), (3S, R) |
| 6 | m-(SO ₂ NH ₂)Ph | CO |  |  | (NHBz) | 2 μM (2R, 3R) |
| 7 | (CH ₂) ₂ CONH ₂ | CO |  |  | (OH) | 25 μM (2R, 3S) |
| 8 | (CH ₂) ₂ CONH ₂ | CO |  | CH ₂ -CH(CH ₃) ₂ | (OH) | 50 μM (2R, 3S) |

REVENDICATIONS

1. Composé caractérisé en ce qu'il répond à la formule
générale (I) :



dans laquelle :

- X représente :

- un groupement méthylène ou
- un groupement carbonyle,

- R₁ représente :

- un groupement alkyle, alkoxyalkyle, alkylthioalkyle, halo-alkyle, cycloalkyle, hétérocycloalkyle, (cycloalkyl)alkyle, (hétérocycloalkyle)alkyle, aryle, arylalkyle, hétéroaryle, ou (hétéroaryl)alkyle, substitué sur la chaîne alkyle ou sur le cycle par au moins un groupement R₇ choisi parmi :

un groupe sulfonamide -SO₂NH₂, -SO₂NHR₈ ou -SO₂N(R₈)₂,

un groupe amide, -CONH₂, -CONHR₈ ou -CON(R₈)₂,

avec R₈ étant un groupement alkyle, cycloalkyle, (cycloalkyl)alkyle, aryle ou arylalkyle,

- R₂, R₃ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupement alkyle, alkoxyalkyle, carboxyalkyle, halo-alkyle, hydroxyalkyle, aminoalkyle, alkylthioalkyle, cycloalkyle, hétérocycloalkyle, (cycloalkyl)alkyle, (hétérocycloalkyle)alkyle, aryle, arylalkyle, arylarylalkyle, hétéroaryle, (hétéroaryl)alkyle, carbamoylalkyle, guanidinyalkyle,

- R₄ représente

- un atome d'hydrogène,
- un groupement acétyle,
- 5 • un groupement benzoyle,
- un groupement -SR₉ avec R₉ étant un groupement alkyle, cycloalkyle, (cycloalkyl)alkyle, aryle, arylalkyle ou
- un groupement

10 -S-CH[CHR₁-NH₂]-X-N(R₅)CHR₂CON(R₆)CHR₃COZ,

avec R₁, X, R₅, R₂, R₆, R₃ et Z tels que définis ci-dessus ou ci-après,

15 -R₅ et R₆ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupement alkyle, cycloalkyle, (cycloalkyl)alkyle, aryle, arylalkyle, hétéroaryle, (hétéroaryl)alkyle,

20 - R₂ et R₅ pris ensemble peuvent éventuellement constituer avec l'atome d'azote portant R₅ un groupement hétérocycloalkyle éventuellement condensé avec un aryle, ou un hétéroaryle,

25 - R₃ et R₆ pris ensemble peuvent éventuellement constituer avec l'atome d'azote portant R₆ un groupement hétérocycloalkyle éventuellement condensé avec un aryle ou un hétéroaryle,

30 - Z représente un groupement OH, OR₁₀, NH₂, NHR₁₀, N(R₁₀)₂, avec R₁₀ étant un groupement alkyle, cycloalkyle, (cycloalkyl)alkyle, aryle ou arylalkyle,

et leurs dérivés.

35 2. Composé de formule générale I selon la revendication 1, dans laquelle R₁ est un groupement alkyle, cycloalkyle, aryle, hétéroaryle, substitué par au moins un groupement -SO₂NH₂, -SO₂NHR₈, -SO₂N(R₈)₂, avec R₈ représentant un groupement alkyle, cycloalkyle, (cycloalkyl)alkyle, aryle ou arylalkyle.

3. Composé de formule générale I selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle X représente un groupement carbonyle.

4. Composé de formule générale I selon la revendication 1 ou 3 dans laquelle X représente une fonction carbonyle et R_1 représente un groupement alkyle, cycloalkyle, aryle ou hétéroaryle, substitué par au moins un groupement $-SO_2NH_2$, $-SO_2NHR_8$, $-SO_2N(R_8)_2$, $-CONH_2$, $-CONHR_8$, $-CON(R_8)_2$, avec R_8 représentant un groupement alkyle, cycloalkyle, (cycloalkyl)alkyle, aryle ou arylalkyle.

5. Composé de formule générale I selon la revendication 4 dans laquelle R_1 représente de préférence un groupement $(CH_2)_nSO_2NH_2$, $(CH_2)_nCONH_2$ ou $(SO_2NH_2)Ph$ avec n compris entre 1 et 5.

6. Composé de formule générale I selon l'une des revendications 1 à 5 dans laquelle R_4 , R_5 , et R_6 représentent un atome d'hydrogène, X une fonction CO, et R_1 un groupement $(CH_2)_2SO_2NH_2$.

7. Composé de formule générale I selon l'une des revendications 1 à 5 dans laquelle R_4 , R_5 , et R_6 représentent un atome d'hydrogène, X une fonction CO, R_1 un groupement $(SO_2NH_2)Ph$.

8. Composé de formule générale selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce qu'il présente de préférence une configuration absolue (S) ou (R) sur le carbone portant le groupement R_1 , (S) ou (R) sur le carbone portant la fonction $-SR_4$, et (S) sur les carbones portant les groupements R_2 et R_3 .

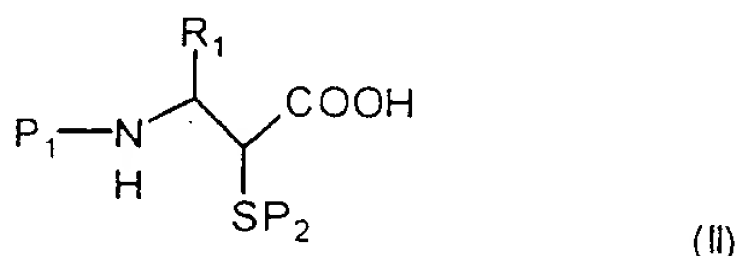
9. Composé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il s'agit de préférence d'un composé choisi parmi

- N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanoyl)- L-Valyl)- L-Isoleucine,
- N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanoyl)- L-Valyl)- L-Isoleucyl- benzylamide,
- N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanoyl)- L-Tyrosyl)- L-Histidine,

- N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentanoyl)- L-Tyrosyl)- L-Histidyl-benzylamide,
- N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-sulfamoyl pentyl)-L-Tyrosyl)-L-Histidine,
- 5 - N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 3-(3-sulfamoyl) phényl propanoyl)- L-Tyrosyl)- L-Histidyl-benzylamide,
- N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-carbamoyl pentanoyl)-L-β(2-naphtyl)-Ala-L-β(2-naphtyl)-Alanine,
- N-(N-(2-mercapto, 3-amino, 5-carbamoyl pentanoyl)-L-Trp)-L-Leucine.

10. Procédé de préparation d'un composé de formule générale (I) selon l'une des revendications 1 à 9 dans laquelle X représente un groupement carbonyle, CO, par couplage d'un acide de

15 formule générale (II) :

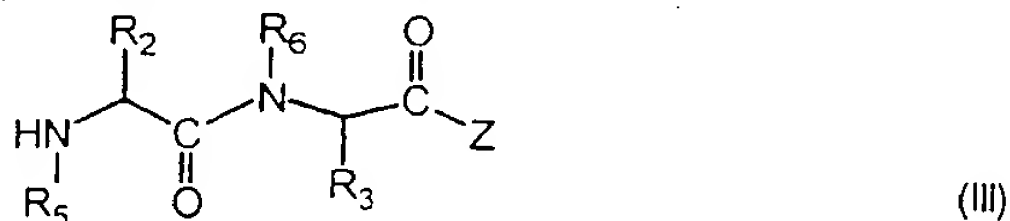


dans laquelle:

- 20 - P_1 représente un groupement tertbutyloxycarbonyle ou benzyloxycarbonyle,
- P_2 représente un groupement 4-méthoxybenzyle ou 2,4 diméthoxybenzyle,
- avec R_1 étant défini selon la revendication 1,

25

avec une amine de formule générale (III)

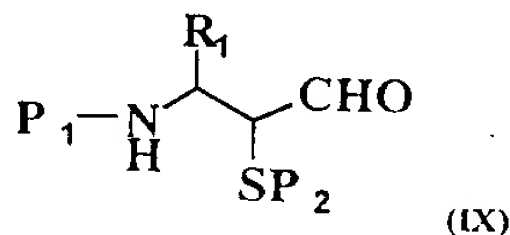


dans laquelle:

- 30 R_2 et R_3 , R_5 , R_6 et Z sont définis selon la revendication 1,

dans un solvant organique, en présence d'un agent de couplage et d'une amine tertiaire à une température de l'ordre de 20°C.

5 11. Procédé de préparation d'un composé de formule générale (I) selon l'une des revendications 1, 2 et 8 dans laquelle X représente un groupement méthylène, CH₂, par traitement d'une amine de formule générale (III) telle que définie en revendication 10 avec une aldéhyde de formule (IX)



dans laquelle R₁, P₁ et P₂ sont définis selon la revendication 10 au sein d'un solvant organique et en présence d'un catalyseur.

15 12. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif au moins un composé de formule générale (I) tel que défini en revendication 1 à 9.

20 13. Composition pharmaceutique selon la revendication 12 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

25 14. Composition pharmaceutique selon la revendication 12 ou 13, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins une toxine clostridiale.

15. Composition selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une neurotoxine botulique ou tétanique.

30 16. Système de diagnostic pour détecter des neurotoxines clostridiales caractérisé en ce qu'il comprend au moins un composé de formule générale I selon l'une des revendications 1 à 9.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der = Internationale No

PCT/FR 98/02401

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C07K5/02 A61K38/06 G01N33/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|---|-------------------------------|
| X | EP 0 181 644 A (SQUIBB & SONS INC) 21 mai 1986 | 1, 11, 14 |
| Y | voir le document en entier voir page 4, ligne 17 - ligne 30 voir page 14 - page 15; revendications | 2-9 |
| X | M. GORDON ET AL: "Design of novel inhibitors of aminopeptidases. Synthesis of peptide-derived diamino thiols and sulfur replacements analogues of bestatin" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY., vol. 91, 1988, pages 2199-2211, XP002072921 WASHINGTON US | 1, 10, 11, 14 |
| Y | Scheme II, step m - scheme IV, step b voir le document en entier voir page 2, ligne 25 - page 3, ligne 1 | 2-9 |
| | --- -/-- | |



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 février 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24/02/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Cervigni, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02401

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|--|--|
| EP 0181644 A | 21-05-1986 | US 4636560 A CA 1262010 A DE 3583851 A JP 61122298 A | 13-01-1987 26-09-1989 26-09-1991 10-06-1986 |
| EP 0333000 A | 20-09-1989 | AU 3138389 A CA 1331419 A ES 2054904 T JP 2004748 A US 5145872 A | 21-09-1989 09-08-1994 16-08-1994 09-01-1990 08-09-1992 |
| EP 0454302 A | 30-10-1991 | CA 2039341 A JP 4217995 A | 01-10-1991 07-08-1992 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 98/02401

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K5/02 A61K38/06 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| X | EP 0 181 644 A (SQUIBB & SONS INC) 21 May 1986 | 1, 11, 14 |
| Y | see the whole document see page 4, line 17 - line 30 see page 14 - page 15; claims --- | 2-9 |
| X | J.M. GORDON ET AL: "Design of novel inhibitors of aminopeptidases. Synthesis of peptide-derived diamino thiols and sulfur replacements analogues of bestatin" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY., vol. 91, 1988, pages 2199-2211, XP002072921 WASHINGTON US | 1, 10, 11, 14 |
| Y | Scheme II, step m - scheme IV, step b see the whole document see page 2, line 25 - page 3, line 1 --- -/-- | 2-9 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 February 1999

Date of mailing of the international search report

24/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cervigni, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02401

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| X | EP 0 333 000 A (ZAMBON SPA) 20 September 1989 | 1, 10, 14 |
| Y | see the whole document see page 2, line 22 - line 37 --- | 2-9 |
| X | EP 0 454 302 A (BANYU PHARMA CO LTD) 30 October 1991 | 1, 10, 14 |
| Y | see the whole document see page 2, last paragraph --- | 2-9 |
| P, X | MARTIN L ET AL: "Beta-amino-thiols inhibit the zinc metallopeptidase activity of tetanus toxin light chain." JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, (1998 AUG 27) 41 (18) 3450-60., XP002092584 United States see the whole document ----- | 1-17 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: le Internationale No
PCT/FR 98/02401

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | EP 0 333 000 A (ZAMBON SPA) 20 septembre 1989 | 1,10,14 |
| Y | voir le document en entier voir page 2, ligne 22 - ligne 37 --- | 2-9 |
| X | EP 0 454 302 A (BANYU PHARMA CO LTD) 30 octobre 1991 | 1,10,14 |
| Y | voir le document en entier voir page 2, dernier alinéa --- | 2-9 |
| P,X | MARTIN L ET AL: "Beta-amino-thiols inhibit the zinc metallopeptidase activity of tetanus toxin light chain." JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, (1998 AUG 27) 41 (18) 3450-60., XP002092584 United States voir le document en entier ----- | 1-17 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De: e Internationale No

PCT/FR 98/02401

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| EP 0181644 A | 21-05-1986 | US 4636560 A | 13-01-1987 |
| | | CA 1262010 A | 26-09-1989 |
| | | DE 3583851 A | 26-09-1991 |
| | | JP 61122298 A | 10-06-1986 |
| EP 0333000 A | 20-09-1989 | AU 3138389 A | 21-09-1989 |
| | | CA 1331419 A | 09-08-1994 |
| | | ES 2054904 T | 16-08-1994 |
| | | JP 2004748 A | 09-01-1990 |
| | | US 5145872 A | 08-09-1992 |
| EP 0454302 A | 30-10-1991 | CA 2039341 A | 01-10-1991 |
| | | JP 4217995 A | 07-08-1992 |